

Université de Sherbrooke

Développement de nouveaux agents diagnostiques pour le dépistage du cancer par la modification d'analogues peptidiques hormonaux.

Par

Jean-François Fournier

Département de Radiobiologie et de Médecine Nucléaire,
Faculté de médecine,
Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada,
J1H 5N4

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M. Sc.)

Le 14 juin de l'année 1996



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-21753-1

Table des matières

Liste des illustrations	i
Figures	i
Tableaux	iii
Liste des sigles, abréviations et symboles	iv
Résumé	v
 I. Introduction	 1
I.1- La médecine et l'imagerie médicale	2
I.2- Les hormones	4
I.2.1- La somatostatine	4
I.2.2- La GHRH	8
I.2.3- La LHRH	12
 II. Matériel et Méthodes	 18
II.1- Produits chimiques	19
II.2- Produits biologiques	19
II.3- Radioactivité	20
II.4- Peptides	20
 II.A- La chimie	 21
II.A.1- Iodination du MK-678	21
II.A.2- Synthèse du ¹²⁵ I-Hexareline	23
II.A.3- Synthèse du ¹²⁵ I-Antarelix	24
II.A.4- Synthèse du [¹¹¹ In-DTPA]-Hexareline	26
II.A.5- Synthèse du Hexareline-B&H	28

II.A.6- Synthèse du Hexareline-Dextran	30
II.A.7- Synthèse du ¹¹¹ In-Antarelix	31
II.B- La biologie	33
II.B.1- Culture cellulaire.	33
II.B.2- Études pharmacocinétiques	33
II.B.3- Études <i>in vitro</i>	35
II.C- Autres	37
II.C.1- Stockage des fractions purifiées par HPLC	37
II.C.2- Stabilité des produits en solution	37
III. Résultats	39
III.A- Études chimiques	40
III.A.1- Purification du MK-678 iodé	40
III.A.2- Purification de l'Hexareline iodé	41
III.A.3- Purification du l'Antarelix iodé à l'iodogène	42
III.A.4- Purification de l' [¹¹¹ In-DTPA]-Hexareline	44
III.A.5- Purification de l'Hexareline-B&H	46
III.A.6- Purification de l'Hexareline-Dextran	47
III.A.7- Purification de l' ¹¹¹ In-Antarelix	49

III.B- Études biologiques	50
III.B.1- MK-678 iodé	50
III.B.2- L'Hexareline iodé	54
III.B.3- L'Antarelix iodé	57
III.B.4- L' [¹¹¹ In-DTPA]-Hexareline	61
III.B.5- L'Hexareline-B&H	67
III.B.6- L'Hexareline-Dextran	68
III.B.7- Liaisons spécifiques <i>in vitro</i> de l' Antarelix iodé	69
 III.C- Autres résultats	 74
III.C.1- Stabilité <i>in vitro</i> de l'Antarelix iodé	74
 IV. Discussion	 75
IV.A- La chimie	76
IV.A.1- Chimie de l'iodination des peptides	76
IV.A.1.i)- Le MK-678 iodé	78
IV.A.1.ii)- L'Hexarelin iodé	78
IV.A.1.iii)- L'Antarelix iodé	80
IV.A.2- Chimie de chélation	81
IV.A.2.i)- L'Hexarelin-DTPA	82
IV.A.2.ii)- L'Hexarelin-B&H	83
IV.A.2.iii)- L'Hexarelin-Dextran	83
IV.A.3- Chimie de marquage direct	84
IV.A.3.i)- L'Antarelix- ¹¹¹ In	84

IV.B- La biologie	85
IV.B.1- Pharmacocinétique	85
IV.B.2- Essais radioimmunologiques (RIA)	87
IV.B.3- Études de liaison <i>in vitro</i>	91
 V. Conclusion	 94
VI. Remerciements	95
VII. Bibliographie	96
VIII. Annexes	107
1. Clairances sanguines	107
2. Feuille de calculs	109
3. Calcul de l'erreur	110

Liste des illustrations

Figures

Figure 1. Schéma de la technique d'imagerie médicale SPECT	2
Figure 2. Somatostatine (SS-14) et la prosomatostatine (SS-28)	4
Figure 3. La glande pituitaire antérieure (hypophyse) chez l'humain	5
Figure 4. La cascade des réactions activées par l'AMPc	6
Figure 5. Modèles tumoraux	7
Figure 6. Analogues de Somatostatine	7
Figure 7. Récepteur transmembranaire	8
Figure 8. La GHRH	9
Figure 9. Quelques analogues de GHRPs, ainsi que leur effet sur la dose de GH	10
Figure 10. L'évolution des endorphines à l'Hexarelin	10
Figure 11. La gonadotropine (LHRH)	13
Figure 12. L'Antarelix	14
Figure 13. Réaction de l'iode moléculaire dans une solution aqueuse	21
Figure 14. Réaction du MK-678 à l'iode radioactive	22
Figure 15. Réaction de l'Hexarelin à l'iode-125	23
Figure 16. Réaction de l'Antarelix à l'iode-125	24
Figure 17. Réaction de l'Hexarelin à l'acide diéthylenetriamine pentatacétique (DTPA)	27
Figure 18. Réactions du substrats B&H avec l'iode-125	29
Figure 19. La transformation du dextran à la forme liée au peptide	30
Figure 20. Marquage directe de l'Antarelix à l'indium-111	32
Figure 21. Méthode élaborée pour les études d'excrétion chez la souris	34
Figure 22. Méthode d'analyse de chromatographie à couche mince	38
Figure 23. HPLC du MK-678 et de ses dérivés iodés	41

Figure 24. HPLC de l'Hexarelin et de ses dérivés iodés	42
Figure 25. HPLC de l'Antarelix iodé	43
Figure 26. HPLC de l'Hexarelin lié au DTPA	44
Figure 27. Chromatogramme du marquage à l'indium-111 du pic 1 élué à 31 minutes	45
Figure 28. Chromatogramme du marquage à l'indium-111 du pic 2 élué à 43 minutes	46
Figure 29. HPLC de la réaction de l'Hexarelin et du B&H	47
Figure 30. Séparation sur colonne PD-10 de la réaction de l'Hexarelin et du Dextran	48
Figure 31. HPLC sur colonne C-4 delta-pack de l'Antarelix marqué à l'indium-111	49
Figure 32. Biodistribution du ¹²⁵ I-MK-678	50
Figure 33. Clairance plasmatique du ¹²⁵ I-MK-678	51
Figure 34. Excrétion du ¹²⁵ I-MK-678	52
Figure 35. L'hématocrite à la suite de l'injection du ¹²⁵ I-MK-678	53
Figure 36. Biodistribution du ¹²⁵ I-Hexarelin	54
Figure 37. Clairance plasmatique de ¹²⁵ I-Hexarelin	55
Figure 38. Excrétion du ¹²⁵ I-Hexarelin	56
Figure 39. Variation du niveau de l'hématocrite après incorporation de ¹²⁵ I-Hexarelin	57
Figure 40. Biodistribution du ¹²⁵ I-Antarelix	57
Figure 41. Clairance plasmatique du ¹²⁵ I-Antarelix	59
Figure 42. Excrétion totale du ¹²⁵ I-Antarelix	60
Figure 43. L'hématocrite après injection de l' ¹²⁵ I-Antarelix	60
Figure 44. Biodistribution du [¹¹¹ In-DTPA]-Hexarelin	61
Figure 45. Clairance plasmatique du complexe [¹¹¹ In-DTPA]-Hexarelin	63
Figure 46. Excrétion du complexe [¹¹¹ In-DTPA]-Hexarelin	64
Figure 47. L'hématocrite après injection du dérivé d'Hexarelin lié au DTPA; fraction 1	64
Figure 48. RIA des fractions de la réaction de l'Hexarelin et du substrats DTPA	66
Figure 49. RIA des fractions de la réaction de l'Hexarelin et du substrats B&H	67
Figure 50. RIA des fractions de la réaction de l'Hexarelin et du substrats Dextran	69

Figure 51. Liaison <i>in vitro</i> de l'Antarelix iodé aux cellules EMT-6 à 4 degrés Celsius en suspension ..	70
Figure 52. Liaison <i>in vitro</i> de l'Antarelix iodé aux cellules EMT-6 à 4 degrés Celsius en pétris	70
Figure 53. Liaison <i>in vitro</i> de l'Antarelix iodé aux cellules EMT-6 à 37 degrés Celsius en pétris	71
Figure 54. Liaison <i>in vitro</i> de l'Antarelix iodé aux cellules EMT-6 sous différentes conditions	72
Figure 55. Liaison <i>in vitro</i> de l'Antarelix iodé aux cellules MCF-7 à 4 degrés Celsius en suspension ..	73
Figure 56. Liaison <i>in vitro</i> de l'Antarelix iodé aux cellules MCF-7 à 37 degrés Celsius en pétris	73
Figure 57. Chromatographie sur couche mince (TLC) dans le PBS	74

Tableaux

Tableau 1.	Résultats numériques de la biodistribution du ¹²⁵ I-MK-678	50
Tableau 2.	Résultats numériques de la biodistribution Hexarelin iodé	54
Tableau 3.	Valeurs numériques de la biodistribution l'Antarelix iodé	58
Tableau 4.	Valeurs numériques de la biodistribution du [¹¹¹ In-DTPA]-Hexarelin	62
Tableau 5.	Comparaison des différents ratios tumoraux	66
Tableau 6.	Clairance sanguine	107
Tableau 7.	Élimination sanguine de l'iode	108

Liste des sigles, abréviations et symboles

a.i.	Après injection	HEPES	Hydroxyethylpiperazine ethane sulfonic acid
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique	HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
ARN	Acide ribonucléique	IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1
ATP	Adénosine triphosphate	IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
B&H	Bolton & Hunter	LH	Luteinizing Hormone
BSA	Bovine serum albumin	LHRH	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
CT	Computed tomography	NCS	New -born Calf Serum
d.i.	Dose injectée	PBS	Phosphate Buffer Solution
DMF	Diméthylformamide	RIA	Radioimmunoassay
DTPA	Diethylenetriamine pentaacetic acid	SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
ETDA	Ethylenediaminetetraacetic acid	SS	Somatostatine
FSH	Follicule Stimulating Hormone	TEP	Tomographie par Emission de Positrons
GH	Growth Hormone	TFA	Trifluoroacetic acid
GHRH	Growth Hormone-Releasing Hormone	TLC	Thin Layer Chromatography
GnRH	Gonadotropine-Releasing Hormone	TPN	Température et Pression Normales
GRIF	Growth Hormone-Releasing Factor (SS)		
HBSS	Hank's balanced salt solution		

Résumé

Différentes hormones peptidiques ont été modifiées afin de développer de nouveaux agents diagnostiques pour le dépistage du cancer. Entre autre, un analogue de la famille des GHRPs, l'Hexareline, a été modifié par: Iodination directe; par chélation d'un groupement marquable à l'iode, le N-hydroxysuccinimidyl p-hydroxyphénylpropionate (Bolton & Hunter); ou par chélation à l'indium grâce à l'acide diéthylènetriamine pentaacétique (DTPA). De plus un analogue de la LHRH, l'Antarelix, a été modifié par iodination ou par liaison directe à l'indium. Un analogue de la somatostatine (SS) le MK-678 a été utilisé comme base d'apprentissage et comme contrôle. Finalement, l'Hexareline a fait l'objet d'études de liaison au dextran (Dx); molécule utilisé pour le marquage au technétium. Les résultats des divers essais de marquages sont intéressants avec des rendement de marquage allant de 6% pour l'Hexareline iodé jusqu'à 48% dans le cas de l'['¹¹¹In-DTPA]-Hexareline. Malgré, dans certains cas, de bons rendements chimiques, les résultats biologiques au niveau tumoral sont médiocres et ne démontrent aucune captation spécifique supérieure à celles retrouvées dans les tissus périphériques. Cependant, les résultats obtenus lors de l'étude de l'Hexarelin-DTPA ont démontré une importante fixation rénale (près de 20% d.i./g). D'autre part, l'Antarelix, antagoniste de GnRH, marqué à l'iode-125, a démontré une forte captation hypophysaire (185-400% d.i./g). Ces analogues peptidiques, dans le contexte de l'étude présente, c'est-à-dire en considération des cellules tumorales utilisées (EMT-6 et MCF-7), sont inappropriés pour le développement d'agents diagnostiques pour le dépistage du cancer. Toutefois, si d'autres types de cellules tumorales étaient disponibles (des cellules sélectionnées pour leurs récepteurs de GnRH), les résultats pourraient être différents. De plus, la fixation rénale obtenue lors des études pharmacocinétiques de l'Hexareline lié au DTPA pourrait faire l'objet d'études plus approfondies.

I. Introduction

La médecine et l'imagerie médicale

Nous sommes à l'approche du 21^e siècle et les sciences médicales sont en plein essor. Plusieurs nouvelles découvertes ont caractérisé la fin du 20^e siècle, tels le traitement du cancer de la moelle osseuse (Preisler, 1994), la détection précoce et le traitement du cancer de la prostate (Allain *et al.*, 1994), l'identification de plusieurs gènes responsables de maladies graves, par exemple la fibrose kystique (Riordan *et al.*, 1989), ou de problèmes de santé, comme l'obésité (Arner, 1995). En ce qui concerne la médecine nucléaire, il y a toute la panoplie des nouvelles technologies de diagnostic, la IRM (imagerie par résonance magnétique), la TEP (tomographie par émission de positrons), le CT scan ("X-ray computed tomography"), l'imagerie par ultrasons, l'imagerie par infrarouge, et bien sûr, le SPECT ("single photon emission computed tomography") (fig. 1).

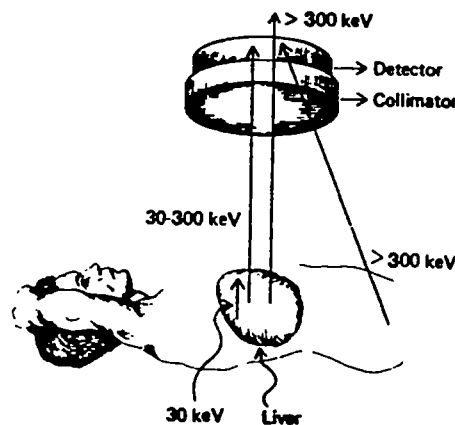


Figure 1. Schéma de la technique d'imagerie médicale SPECT (Saha, 1992).

Le SPECT exige, contrairement au X-ray CT, une source émettrice venant de l'intérieur d'un organisme. La position de cette dernière est inconnue et doit être retracée à l'aide d'un système de détection collimaté dans le but de fournir une direction aux photons incidents. Cette caméra gamma a la particularité de fournir des informations de distribution spatio-temporelle connue sous le nom de scintigraphie dynamique. Cette forme d'imagerie permet aux types de radionucléides utilisés d'exprimer la fonction de l'organe ou du système examiné (Ott *et al.*, 1988).

Pour que cette dernière technologie d'imagerie soit exploitée au maximum, de nombreux produits radiopharmaceutiques ont vu le jour et de nouveaux le sont quotidiennement. Tous ces agents diagnostiques ont été développés dans un but ultime, découvrir un moyen de cibler directement un site anormal afin de l'analyser et de l'éliminer, si cela se trouve nécessaire, par les méthodes chirurgicales conventionnelles, ou par des méthodes moins envahissantes tel que le transport direct de molécules cytotoxiques.

Un grand nombre de chercheurs aspirent à découvrir ce que l'on nomme "The Magic Bullet", un moyen d'atteindre directement les tissus cancéreux sans pour autant nuire aux tissus sains environnants. C'est le cas de l'intérêt porté sur les peptides porteurs de radio-isotopes.

Parallèlement au mécanisme d'action "anticorps-antigènes", l'utilisation d'un système ligand-récepteur comme méthode de pour cibler des tissus tumoraux, à l'aide d'hormones ou de séquences peptidiques porteurs d'un radio-isotope, semble de plus en plus étudié et très prometteur. Cette méthode est déjà en pratique en clinique avec l'utilisation de la somatostatine (SS), hormone déterminante au processus de croissance cellulaire (Frohman *et al.*, 1990).

Cette technique m'amène donc à introduire mon sujet de maîtrise qui, en fait, est une extension à la méthode de la SS déjà en pratique et qui pourrait s'ajouter aux systèmes déjà existants. La somatostatine est ici utilisée comme base de travail servant de référence aux études de marquage. Le but de ce travail est de développer de nouveaux agents peptidiques, radiomarqués, pour le dépistage du cancer. Les effets physiologiques et métaboliques des molécules biologiques utilisées ne sont en aucun temps sous investigations.

Afin d'appuyer le choix de ces analogues peptidiques hormonaux sur tout autre type de séquences peptidiques, il est impératif de connaître les liens et les effets qu'ont ces molécules sur l'organisme. Certaines caractéristiques physiques et biologiques, par exemple, des structures plus stables *in vivo* et des effets antitumoraux, valident davantage le choix de ces peptides. C'est dans l'optique de créer une bonne fondation au travail de recherche que les analogues étudiés, ainsi que leurs familles, sont décrits en profondeur.

SS-14

Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
 └───────────────────────────┘

 1 14
Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-

SS-28

-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
 └───────────────────────────┘

Les hormones font partie intégrante de la machine vivante et sont essentielles à son bon fonctionnement. Elles sont les messagères qui portent une nouvelle d'action, ou d'inaction, à un endroit bien spécifique du corps. En 1978, Guillemin et ses collègues ont été les premiers à découvrir et à rapporter la structure de la somatostatine (SS), hormone inhibitrice de croissance, aussi connue sous le nom de GRIF (Growth Hormone-Releasing-Inhibiting Factor). La SS, maintenant bien connue et bien caractérisée, possède une structure circulaire longue de 14 (SS-14) ou de 28 (SS-28) acides aminés (Bakker *et al.*, 1992; Hadley,

1992) (fig. 2). Synthétisée et sécrétée au niveau de l'hypothalamus (fig. 3), elle agit sur la glande pituitaire antérieure afin d'inhiber la sécrétion de somatotropine (hormones de croissance) (Bakker *et al.*, 1992). De nos jours, nous savons que la SS et les dérivés peptidiques de la SS sont retrouvés dans d'autres régions du cerveau, tels que le ganglion de la base (basal ganglia), le cervelet, et les régions limbiques où elle a une implication sur l'expression des activités locomotrices, ainsi que sur le processus de la mémoire et de l'apprentissage. On la retrouve aussi ailleurs dans l'organisme, telles que la voie gastro-intestinale, la moelle épinière et le pancréas (spécifiquement dans les cellules-D des îlots pancréatiques (Bakker, 1992) où elle inhibe la sécrétion de nombreuses hormones incluant le glucagon et l'insuline (Reisine *et al.*, 1990).

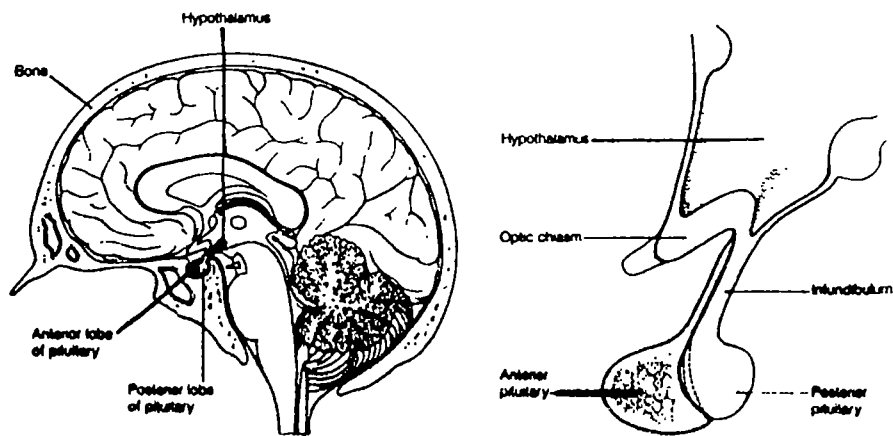


Figure 3. Schéma de la glande pituitaire antérieure (hypophyse) et de l'hypothalamus chez l'humain (Hadley, 1992).

La SS, par l'entremise de récepteurs transmembranaires, agit de façon à inactiver le mécanisme du second messenger (Weckbecker *et al.*, 1993). Ce dernier (fig. 4) est défini par une cascade de réactions cellulaires normalement déclenchée par l'interaction d'une hormone d'activation et de son récepteur. Dans le cas d'une activation, l'adenyl cyclase se déclenche et, en présence d'ions de magnésium, transforme l'adénosine triphosphate (ATP) en 3'-5' adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Stryer, 1988). L'AMPc est la clef qui met en branle toute une série de réactions afin de provoquer la sécrétion de plusieurs hormones, entre autre, la GH (Growth Hormone) (Reisine *et al.*, 1990). La GH (somatotropine) est un polypeptide long de 191 acide aminés et ses effets d'origine hypophysaire, sont caractérisés par une stimulation de la captation d'acides aminés par les cellules touchées et par une stimulation de la

production hépatique de IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), qui à son tour, cause la croissance des os et des muscles (Darnell *et al.*, 1990).

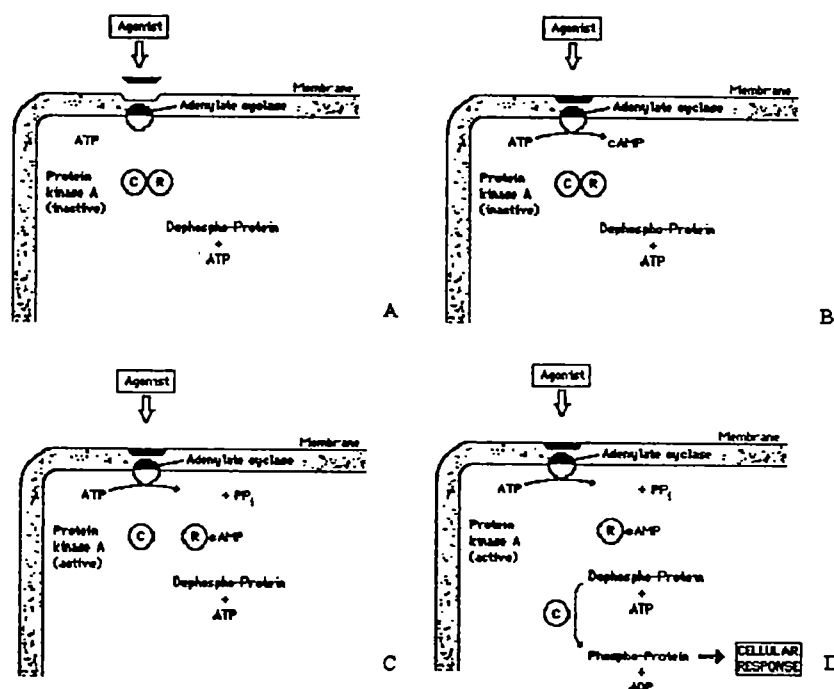


Figure 4. Schéma de la cascade des réactions activées par l'AMPc. Événement chronologique représenté de A à D.

Les tissus cancéreux sont caractérisés par une croissance cellulaire non contrôlée. L'utilisation des peptides pour le diagnostic et/ou pour le traitement de certains cancers est très intéressante dans deux situations différentes: pour des tumeurs synthétisant et sécrétant des quantités excessives de ces peptides (A); et pour des tumeurs qui possèdent une grande densité de récepteurs spécifiques pour un peptide particulier (B) (Reubi, 1993) (fig. 5). Ce dernier est d'un autant plus grand intérêt parce que cette augmentation de la concentration des récepteurs favorise une meilleure détection des tissus tumoraux par le marquage radioactif d'une hormone ou d'un de ses analogues. Plusieurs cancers (du sein, de la

prostate, du pancréas, etc.) sont très bien diagnostiqués grâce à la somatostatine (SS-14, SS-28) et surtout grâce à ses analogues beaucoup plus petits et beaucoup plus puissants. Ces analogues sont en grande quantité et ils sont très variés. On y retrouve, entre autre, le BIM 23014 (Somatulin), le RC-160 (Vapreotide), le MK-678 (Segletide, non présenté à la figure 6) et bien sûr, l'Ocréotide (Sandostatin) (Prévost *et al.*, 1992; Varnum *et al.*, 1994; Schally *et al.*, 1988; Reisine *et al.*, 1990; Lamberts *et al.*, 1990; Weckbecker *et al.*, 1992) (fig.6). Ces dérivés de la SS peuvent être modifiés de plusieurs façons afin de convenir aux besoins recherchés, imagerie statique ou dynamique, excrétion hépatique ou rénale (Moretti *et al.*, 1991) et même à des fins thérapeutiques (Krenning *et al.*, 1994a). Leurs caractéristiques avantageuses sur la SS naturelle sont: 1) une inhibition plus puissante de GH; 2) une demi-vie sanguine plus longue, causant des effets inhibiteurs prolongés sur les organes cibles; 3) une activité vérifiée après injection sous-cutanée; 4) aucun rebond d'hypersécrétion après leur administration (Lamberts *et al.*, 1990).

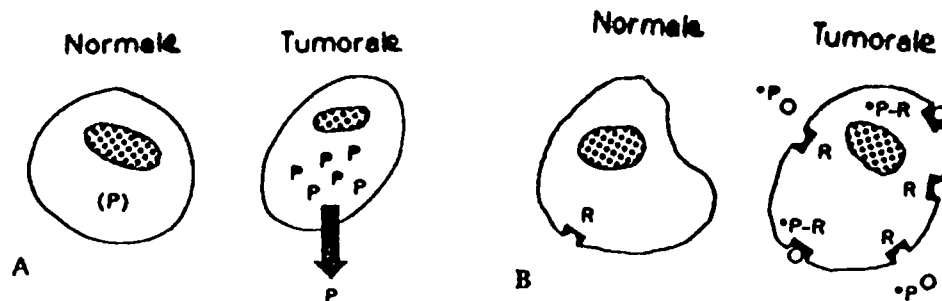


Figure 5. Modèle tumoral hypersynthétisant et hypersécrétant (A) et à grande densité de récepteurs (B) (Reubi, 1993).

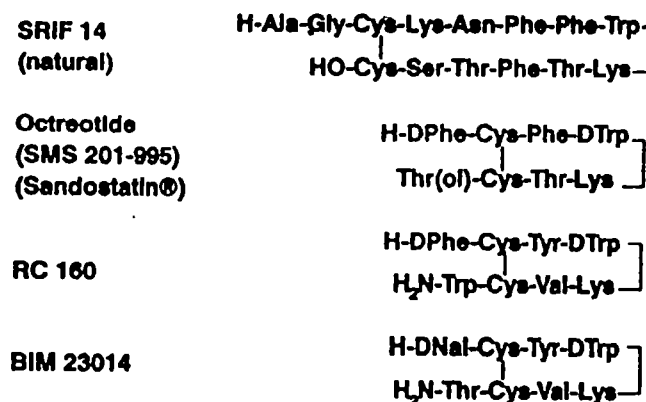


Figure 6. Structure des différents analogues de somatostatine (Weckbecker *et al.*, 1993).

Il est clair que l'intérêt porté sur la SS est principalement lié à sa capacité comme agent diagnostique et thérapeutique. Étant une hormone reliée à la croissance cellulaire, une quantité importante de cancer (du sein, de la prostate, de l'hypophyse, du pancréas, etc.) peuvent être détectés (Krenning *et al.*, 1994b; Reubi *et al.*, 1993a; Schally, 1988; Macaulay, 1992). L'Octréotide est le plus souvent utilisé dû à ses propriétés biologiques et de son succès clinique (Bakker *et al.*, 1991). Afin de me familiariser au travail en laboratoire, un analogue de la somatostatine, le MK-678, a été utilisé pour des études d'introduction aux techniques de recherche.

2. La GHRH

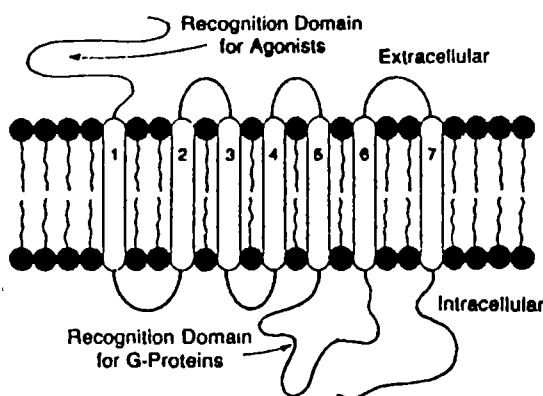


Figure 7. Schéma d'un récepteur transmembranaire comparable à celui de la GHRH et à celui de la Somatostatine (Hadley, 1992).

La SS n'est pas la seule à gérer la régulation de la croissance cellulaire. Sa compétitrice, la GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) ou Somatolibérine, synthétisée et sécrétée au niveau de l'hypothalamus, voyage par la voie hypothalamo-hypophysaire et gère la sécrétion d'hormone de croissance au niveau de la glande pituitaire antérieure par un système ligand-récepteur presque identique à celui de la SS (fig. 4). Son mécanisme d'action implique la stimulation de la transcription de l'ARN messager (ARNm) et de la sécrétion de la GH (Thorner *et al.*, 1990), par le biais de l'augmentation de la concentration des AMPc lors de l'interaction de la GHRH et de son récepteur (Lewin *et al.*, 1983; Hadley, 1992) (fig. 7). Cependant, la sécrétion de la GH survient seulement lorsqu'il y a retrait de la sécrétion hypothalamique de la SS (Thorner *et al.*, 1990). La GHRH est une hormone qui contient 44 acides aminés

(fig. 8) et sert principalement à sécréter les GH lorsqu'elles sont déficientes (Veliçelebi *et al.*, 1986; Vance, 1990).

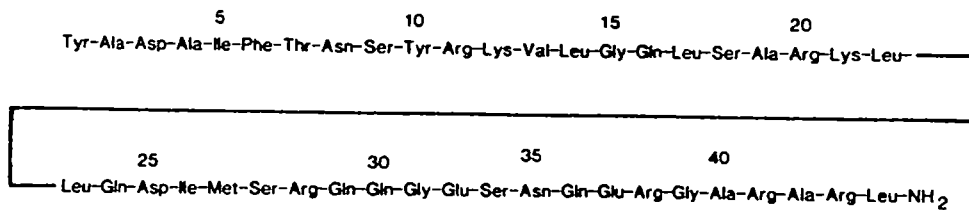


Figure 8. Structure secondaire et séquence des acides aminés de la GHRH (Hadley, 1992).

D'autre part, un groupe de peptide bien particulier possède des propriétés semblables à celles que possèdent la GHRH. Ces polypeptides sont les endorphines. C'est en 1975 que John Hughes et ses collègues isolèrent, la méthionine-enkephaline et la leucine-enkephaline à partir de 630000 hypothalamus de porc (Wieland et Bodanszky, 1991; Stryer, 1988). Un an plus tard, Guillemin et ses collègues isolèrent des peptides plus longs, les endorphines, du lobe intermédiaire de la glande pituitaire (Guillemin, 1978; Stryer, 1988). Étant indispensables au système nerveux, les endorphines sont les neurorégulateurs de la douleur perçue par l'organisme. Ils agissent au niveau des nocicepteurs (récepteurs opiacés) en tant qu'hormone analgésique (Olson *et al.*, 1989). Toutefois, un aspect bien distinct les caractérise. Leur système d'action est jumelé parallèlement au système endocrinien de la GHRH, c'est-à-dire, l'action des endorphines à leurs récepteurs déclenche une sécrétion d'hormones de croissance parallèle à celle déjà connue de la GHRH (Bowers *et al.*, 1980).

Plusieurs chercheurs se sont penchés sur la question pour essayer d'optimiser la sécrétion de GH par le biais des nocicepteurs en y omettant les effets secondaires bien connues, retrouvés lors de l'usage de produits de la même famille des endorphines; morphine, héroïne, opium (Katzung, 1995). C'est en 1977 que les premiers peptides de la série des GHRPs (Growth Hormone-Releasing Peptides) (Bowers *et al.*, 1980) ont été découverts; quelques uns sont listés à la figure 9 (gracieuseté d'Europeptide, Argenteuil,

France). Il sont tous des dérivés du pentapeptide Met-enkephalines (fig. 10) (Roemer *et al.*, 1977; Bowers *et al.*, 1980), ils sont dépourvus d'activité opiacée, ils n'ont aucune relation à la GHRH dans leur séquence peptidique (Maccario *et al.*, 1995; Korbonitz *et al.*, 1995) et pourtant ils agissent au niveau des cellules hypophysaires afin d'en activer la sécrétion de GH (Bowers *et al.*, 1991). Ce n'est que trois ans plus tard qu'un analogue beaucoup plus efficace (mille fois plus important à l'hypothalamus et à l'hypophyse, que la Met-enkephaline), la GHRP-6, a été synthétisé (Bowers *et al.*, 1991).

Dose s.c.	GH (ng/ml) moy. ± SEM (à 20 min.)			Analogue
300 mg/kg	127.0	±	18.6	His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂ (GHRP-6)
300 mg/kg	163.5	±	21.5	His-D-2-Me-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂ (Hexarelin)
300 mg/kg	9.0	±	2.3	His-Ala-D-Trp-Ala-2-Me-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂
300 mg/kg	60.8	±	21.6	His-D-Trp-Ala-2-Me-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂
300 mg/kg	21.6	±	9.5	His-D-Trp-Ala-2-Me-Trp-D-Phe-Ala-Lys-NH ₂
Contrôle	36.9	±	22.3	

Figure 9. Tableau de quelques analogues de GHRPs, ainsi que leur effet sur la dose de GH (Europeptides, Argenteuil, France).

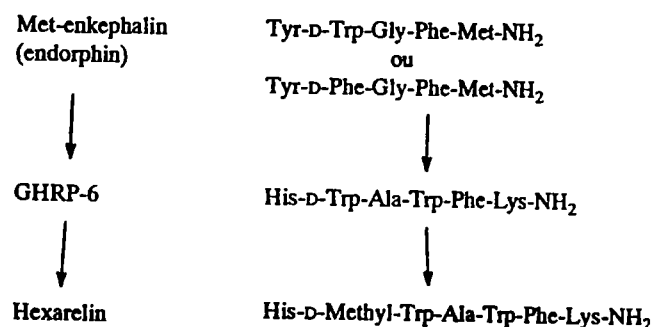


Figure 10. Cheminement simplifié de l'évolution des endorphines à l'Hexarelin.

Plusieurs hypothèses sur le fonctionnement du système GHRP-GH ont été émises: une interaction indépendante des récepteurs de la GHRH, de la SS, et des récepteurs opiacés (Bowers *et al.*, 1980; Arvat *et al.*, 1995; Maccario *et al.*, 1995; Guillaume *et al.*, 1994; Bowers, 1991; Cheng *et al.*, 1989; Conley *et al.*, 1995; Arvat *et al.*, 1994), une fonction antagoniste au système de la SS (Thorner *et al.*, 1990; Guillaume *et al.*, 1994; Conley *et al.*, 1995), un effet non seulement à la glande pituitaire antérieure, mais aussi à l'hypothalamus (Thorner *et al.*, 1990; Codd *et al.*, 1989; Arvat *et al.*, 1995; Conley *et al.*, 1995), une accessibilité à des sources de GH différentes de celle de la GHRH (Cheng *et al.*, 1989), ou la sécrétion d'un facteur hypothalamique inconnu capable d'interagir avec la GHRH (Bowers *et al.*, 1991).

Malgré la quantité importante d'études faites sur le sujet et les nombreuses hypothèses différentes ou contradictoires, le mécanisme d'action des GHRPs sur la sécrétion de somatotropine n'est toujours pas élucidé. Néanmoins, plusieurs nouveaux indices semblent diriger les recherches vers des réponses plus claires. Ce qui laisse croire que les GHRPs agissent par un mécanisme distinct de celui de la GHRH, est: 1) l'effet synergique sur la sécrétion de GH lorsqu'une désensibilisation à l'un des deux types d'hormone est effectuée au préalable (Bowers *et al.*, 1991 et 1993); 2) contrairement à la GHRH, les GHRPs sécrètent les GH via un mécanisme calcium-dépendant et AMPc-indépendant (Cheng *et al.*, 1989; Lewin *et al.*, 1983; Bower *et al.*, 1991; Conley *et al.*, 1995), probablement géré par le mécanisme de la protéine kinase C (Lei *et al.*, 1994); 3) que l'activité inhibitrice sur la sécrétion de GH par le facteur de croissance IGF-1 ne peut être prévenu par les GHRPs étant donné que la concentration de l'IGF-1 dans le sérum n'augmente que seulement plusieurs heures après stimulation de la GH, contrairement à la synergie GHRP-GHRH qui elle est rapide (Bowers *et al.*, 1991); 4) l'inefficacité du Naloxone (antagoniste opiacé) sur la sécrétion de GH par les GHRPs (Korbonits *et al.*, 1995).

Cependant, de nouvelles études tendent à démontrer que malgré les preuves appuyant l'acceptation d'un modèle d'action distinct des GHRPs vis-à-vis la GHRH, les GHRPs emprunteraient malgré tout, du moins en partie, le mécanisme de la GHRH (Conley *et al.*, 1995). L'expression du gène *fos* (Dickson *et al.*, 1993; Guillaume *et al.*, 1994), les sites spécifiques de liaison de la GHRP-6 à l'hypothalamus (Dickson *et al.*,

1993; Codd *et al.*, 1989) et l'augmentation de l'activité neurotrophique d'une population de neurones arciformes reconnues comme étant des cellules contenant des GRF (Growth Hormone Releasing Factor) (Dickson *et al.*, 1993; Guillaume *et al.*, 1994) sont des indices qui, jusqu'à ce jour, appuient l'hypothèse d'une interrelation des GHRPs et de la GHRH.

Dans la grande famille des GHRPs, un nouvel analogue vient accroître l'intérêt déjà très grand sur ces nouveaux sécrétagogues (hormones activant la sécrétion d'autres hormones). L'Hexareline, analogue de la GHRP-6, lui ressemble étrangement par sa structure (fig. 9 et 10) et possède les mêmes caractéristiques physiologiques et davantage. Elle est deux fois plus efficace dans sa fonction sécrétoire de GH, elle est chimiquement (Cella *et al.*, 1995; Arvat *et al.*, 1994) et biologiquement (Cella *et al.*, 1995) plus stable *in vivo* et elle possède une plus grande endurance aux radiations, que la GHRP-6 (Deghenghi *et al.*, 1994). L'Hexareline possède une activité superposable à celle de la GHRP-6 avec un effet soutenu qui se traduit en une puissance accrue vraisemblablement due à son caractère plus lipophile (Cella *et al.*, 1995; Conley *et al.*, 1995; Deghenghi *et al.*, 1994) et aux avantages chimiques et biologiques cités ci-haut. L'Hexareline est présentement en essai clinique (Laron *et al.*, 1994; Cella *et al.*, 1995; Arvat *et al.*, 1994; Arvat *et al.*, 1995; Maccario *et al.*, 1995) et se trouve être un modèle très intéressant pour devenir un agent d'imagerie médicale parallèle aux analogues de la SS.

3. La LHRH

Par ailleurs, une autre hormone qui représente une grande partie de ce mémoire, a été étudiée; l'Antarelix (un analogue antagoniste de la LHRH; Luteinizing Hormone Releasing Hormone). La LHRH est une hormone gonadotrope de l'hypothalamus indispensable au développement sexuel d'un individu. Elle est l'hormone contrôlant la sécrétion de la LH (Luteinizing Hormone) et de FSH (Follicule Stimulating Hormone) au niveau de la glande pituitaire antérieure, qui à leur tour gèrent l'activité hormonale des gonades (Davidson *et al.*, 1994; Weinbauer et Nieschlag, 1992). La LH est une hormone agissant sur les cellules de Leydig responsables de la synthèse et de la sécrétion de la testostérone et du fait de la

formation des spermatozoïdes chez l'homme, et sur les développement des cellules lutéines qui synthétisent et sécrètent la progestérone et l'estrogène, chez la femme. La FSH, de son côté, aide au développement des spermatozoïdes par la sécrétion d'estrogène chez l'homme et au développement du follicule et à l'épanouissement des ovins, chez la femme (Guyton, 1987; Hsueh *et al.*, 1985). La LHRH est donc indirectement responsable du développement des caractéristiques secondaires retrouvées chez l'individu, développement des seins, élargissement des hanches, etc., chez la femme, et de la pilosité, de la musculature, etc., chez l'homme. Cette propriété est très intéressante car plusieurs tissus possèdent des récepteurs pour cette hormone et peuvent être ciblés si un cancer s'y développe.

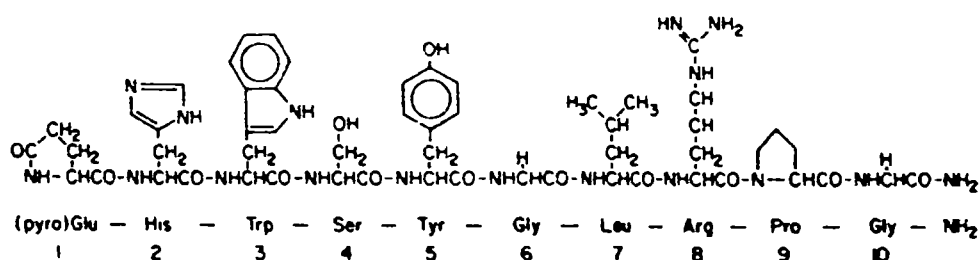


Figure 11. Séquence de la gonadotropine (LHRH) (Hadley, 1992).

C'est au début des années 1970 que Burgus et ses collègues, ainsi que Matsuo et ses collègues, ont séquencé le décapeptide qu'est la LHRH (fig. 11). Une série d'analogues ont été synthétisés pour mieux optimiser leurs réponses biologiques ou pour mieux profiter d'un phénomène et/ou mieux se débarrasser d'un autre. Plus de 3000 de ces analogues ont été testés (Weinbauer et Nieschlag, 1992) et leurs sites actifs identifiés. Les acides aminés les plus importants sont ceux en positions 1, 2 et 3 qui possèdent l'activité de sécrétion hormonale et ceux en positions 6 et 10 qui sont responsables de la liaison aux récepteurs (Schally et Coy, 1983; Sandow et König, 1979). D'autres sites actifs très importants, ceux de

clivage endopeptidasique et de dégradation, sont retrouvés en position 5-6 et 9-10 de la molécule (Carone *et al.*, 1987).

Le but de ces synthèses massives d'analogues est d'optimiser et d'amplifier certaines réponses biologiques déclenchées par l'hormone naturelle. Certains changements spécifiques faits à la molécule naturelle causent différentes réponses biologiques lors d'études pharmacologiques. Par exemple, l'utilisation d'acides aminés-D (plus hydrophobes) accentue énormément l'activité des antagonistes de la LHRH probablement par l'augmentation de la stabilité et de la résistance à la dégradation enzymatique (Flouret *et al.*, 1984; Deghenghi *et al.*, 1993); la substitution spécifique en position 6 par un acide aminé-D basique augmente largement l'activité antioovulatoire (Coy *et al.*, 1982), mais aussi cause un effet secondaire caractérisé par une sécrétion importante d'histamine (Sharoni *et al.*, 1989).

De nouveaux moyens sont étudiés pour améliorer l'efficacité du traitement: 1) soit en faisant une combinaison de deux traitements, c'est-à-dire un agoniste, ou un antagoniste, avec un radical cytotoxique (agent chimiothérapeutique) (Schally *et al.*, 1990; Szende *et al.*, 1990a; Szende *et al.*, 1990b; Bajusz *et al.*, 1989a), ou 2) par l'utilisation des deux types hormonaux; l'agoniste de la LHRH pour la désensibilisation et l'analogue de la somatostatine comme inhibiteur de croissance (Schally *et al.*, 1990; Schally et Redding, 1987; Szende *et al.*, 1989). Ou tout simplement en remplaçant les agonistes par les antagonistes.

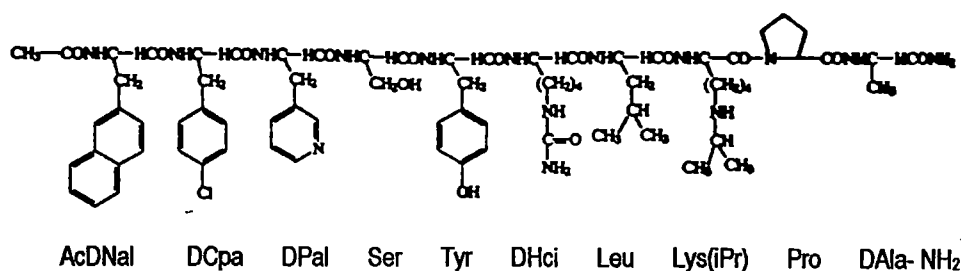


Figure 12. Séquence de l'analogue antagoniste de la LHRH; l'Antarelix.

Chez les antagonistes de la LHRH, les acides aminés-D sont utilisés en positions 1 à 3 afin de supprimer l'effet biologique de sécrétion caractéristique de ces positions pour la LHRH native, et en position 6 et 10 pour maximiser la liaison spécifique aux récepteurs de LHRH, ainsi que diminuer au maximum la dégradation peptidique (Weinbauer et Nieschlag, 1992). Dans le cas des produits les plus récents, incluant l'Antarelix, les modifications suivantes sont retrouvées: l'acide aminé acetyl-D-naphthyl-alanine en position 1, D-chlorophenylalanine en position 2, D-pyridylalanine ou D-tryptophan en position 3, et D-alanine en position 10 (Weinbauer et Nieschlag, 1992) (fig. 12).

Les antagonistes sont la nouvelle génération d'analogues étudiés qui maintenant semblent plus intéressants que leurs prédécesseurs les agonistes. Il est clair, aujourd'hui, que la présence chronique d'un agoniste de la LHRH se traduit par une réponse de désensibilisation pharmacologique qui résulte en une déficience des hormones sexuelles stéroïdiennes (Sharoni *et al.*, 1989). Ce phénomène est techniquement appelé "castration chimiquement induite" (Schally *et al.*, 1987). Cette désensibilisation est caractérisée par un nombre de mécanismes: diminution de l'expression des récepteurs gonadotropiques, modulation d'autres protéines telles que les protéines G, les phospholipases C, les protéines kinases C, épuisement des réserves de gonadotropines sécrétables, *et* altération des modifications post-transcriptionnelles des gonadotropines résultant d'une perte d'activité biologique (Davidson *et al.*, 1994). Cet effet est d'autant plus intéressant, étant donné qu'une grande quantité de cancers sont sécréteurs d'hormones sexuelles stéroïdiennes (LH, FSH) ou possèdent des récepteurs gonadotropes (ex: cancer du sein, gastrique, colorectal, pancréatique, du poumon, de la prostate, et les tumeurs cervicales) (Weckbecker *et al.*, 1993). Ces caractéristiques tumorales sont donc exploitables et ouvrent la voie à des méthodes, non seulement diagnostiques, mais aussi thérapeutiques.

Il est démontré que l'antagoniste, en se logeant et en demeurant dans le site actif du récepteur, peut être d'une plus grande utilité que l'agoniste. L'antagoniste est un analogue qui, une fois logé dans le site actif du récepteur, ne déclenche pas la cascade de réactions jumelée à ce dernier. Il a donc les avantages de ne pas causer une hausse temporaire non désirée des hormones sexuelles stéroïdiennes retrouvées lors

de l'emploi d'agonistes (Schally *et al.*, 1990; Sharoni *et al.*, 1989; Szende *et al.*, 1990a), d'être aussi puissant sur l'inhibition de la sécrétion de la LH, FSH et des stéroïdes sexuels après une seule injection qu'avec une administration chronique de l'agoniste (Schally *et al.*, 1990) et de posséder une plus grande affinité de liaison que les agoniste au niveau hypophysaire (Clayton et Catt, 1980).

Tous savent que les effets antitumoraux observés lors de l'utilisation d'analogues de la LHRH ne sont pas seulement attribués à une déficience de LH, de FSH et de PRL (prolactine) dans le sérum, mais aussi grâce à l'action directe de la molécule au niveau tumoral permis par la présence de récepteurs gonadotropiques de hautes affinités (Schally *et al.*, 1990; Eidne *et al.*, 1985; Eidne *et al.*, 1987; Sharoni *et al.*, 1989; Szende *et al.*, 1989; Vincze *et al.*, 1991).

En plus d'être un inhibiteur plus puissant que l'agoniste, l'antagoniste de la LHRH affecte le développement naturel des récepteurs de FSH et, par le fait même, supprime aussi bien la sécrétion de LH bioactive qu'immunoactive (Weinbauer et Nieschlag, 1992) associée à l'implication du FSH sur le développement des récepteurs de LH et de PRL (Hsueh *et al.*, 1985); diminue clairement les niveaux de FSH immunoactives et davantage ceux bioactives (Dahl *et al.*, 1988; Behre *et al.*, 1992; Huhtaniemi *et al.*, 1988) et dans le cas d'une tumeur de l'hypophyse, réduit la sécrétion de FSH et des sous-unités alpha, contrairement à l'inefficacité de l'agoniste (Daneshdoost *et al.*, 1990; Klibanski *et al.*, 1989).

Malgré les avantages apparents de l'antagoniste sur l'agoniste, aucune étude diagnostique, ni thérapeutique n'a été entreprise. Néanmoins, plusieurs s'accordent pour dire que toute forme de cancer traité avec l'agoniste de la LHRH pourrait être traité aussi bien, sinon mieux, avec l'antagoniste (Weinbauer et Nieschlag, 1992; Conn et Crowley, 1991)

Chez plusieurs types de cellules tumorales, l'antagoniste de la LHRH s'est avéré être très efficace pour en contrer directement (par le biais des récepteurs transmembranaires de la LHRH et non par l'effet indirect stéroïdien) leur croissance. C'est le cas de certaines lignées tumorales humaines de la prostate (Schally

et al., 1990; Davidson *et al.*, 1994; Habenitch *et al.*, 1990; Szepeshazi *et al.*, 1991; Foekens *et al.*, 1992), mammaires (Sharoni *et al.*, 1989; Davidson *et al.*, 1994; Szende *et al.*, 1990a; Reissmann *et al.*, 1992; Sandow *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1985; Eidne *et al.*, 1985; Eidne *et al.*, 1987; Vincze *et al.*, 1991; Segal-Abramson *et al.*, 1992), pancréatique (Szende *et al.*, 1990b). Cependant, l'efficacité de l'antagoniste varie beaucoup entre chaque type de souche tumorale et varie énormément dans le cas des tumeurs mammaires. Une inhibition de seulement 20% allant jusqu'à 84% de la croissance tumorale chez les souches du cancer du sein est obtenue avec l'utilisation d'un antagoniste de la LHRH (Schally *et al.*, 1990).

Comme mentionné plus tôt, il est important de connaître les mécanismes d'action de ces molécules afin d'exploiter au maximum leurs potentiels diagnostiques. Ces systèmes sont absolument nécessaires à l'élaboration de traceurs oncologiques, mais ne feront toutefois l'objet d'aucune étude pharmacologique. Seulement les produits modifiés seront investigués pour leurs caractères diagnostiques.

C'est dans l'optique de développer de nouveaux agents d'imagerie plus spécifiques aux tissus anormaux de l'organisme, tout en profitant des effets antitumoraux des analogues, que ce projet prit forme. J'essaierai donc d'analyser plusieurs méthodes de marquage et d'en étudier les effets *in vitro* et *in vivo*, afin de déterminer l'utilisation potentielle de ces produits chez l'humain pour le dépistage du cancer.

II. Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

1. Produits chimiques

Les produits chimiques (solvents, sels, poudres, etc.) utilisés proviennent de chez Aldrich (Milwaukee, WI, USA), l'albumine bovine, sous forme de BSA provient de chez Sigma (St-Louis, MO, USA), l'iodogène de chez Pierce (Rockford, IL, USA) et l'azote provient de chez Praxair (Mississauga, Ontario, Canada). Le matériel de laboratoire tel les tubes de borosilice proviennent de chez Fisher (Pittsburg, PA, USA), les eppendorfs de chez Falcon (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) et les tips de chez Sarstedt (St-Laurent, Québec, Canada). Le système d'analyse utilisé est un chromatographe liquide de haute résolution (HPLC) Varian 5000 LC, avec une colonne à phase renversée C-18 delta-pack sphérique contenant de particules de 15 μm parsemées de pores d'un diamètre moyen de 300 Å, de chez Waters (Milford, MA, USA), ou C-18 à phase renversée, Ultrasphere ODS, 5 μm de chez Beckman (Mississauga, Ontario, Canada). Un détecteur variable ultra-violet et visible Shimadzu SPD-6AV. Une table graphique à double crayon Varian Model 1200.

2. Produits biologiques

Les produits chimiques utilisés pour les tampons et les milieux de culture cellulaire, Waymouth et MEM, proviennent de chez GIBCO (Burlington, Ontario, Canada). Les souris et les rats utilisés sont respectivement des souris mâles Balb/C de 20g et des rats femelles Fisher de 150 g provenant de chez Charles River Breeding Labs (Montréal, Québec, Canada). Les cellules tumorales étudiées sont les EMT-6 (lignée expérimentale mammaire) fournies par C.W. Lin de Massachusetts General Hospital (Boston, USA), les cellules MAC (adénocarcinome mammaire) du Dr. Bogden à la Banque Tumorale de l'Institut de Recherche Mason (Worcester, Massachusetts, USA) et les MCF-7 (lignée humaine mammaire) de chez ATCC (Rockville, Maryland, USA). Les Pétris p-60, les flacons T-175, les tubes à culture et les seringues sont des produits Falcon qui proviennent de chez Becton Dickinson (Mississauga, Ontario, Canada), ou de

chez Sarstedt (Newton, N.C., USA). Des micropipettes de 50, 200 et 1000 Gilson pipetman de chez Mandel (Lachine, Québec, Canada). Un homogénéisateur Dounce de chez Wheaton Scientific (Millville, NJ, USA). Un incubateur Forma Scientific (Montréal, Québec, Canada). Une hotte Nuaire (Plymouth, MN, USA). Une centrifugeuse Beckman (Palo Alto, CA, USA), une centrifugeuse Baxter Varifuge , centrifugeuse à eppendorf Centrifuge 5415C (Mississauga, Ontario, Canada). Une ultracentrifugeuse Sorval (Newtown, Connecticut, USA). Un compteur gamma Wallac (Turku, Finland). Des capillaires Drummond (Broomall, PA, USA). De l'Halothane-fluothane de chez Wyeth-Ayerst (Montréal, Canada). Un étui à dissection.

3. Radioactivité

L'iode radioactive-125, sous forme d'iodure de sodium (Na^{125}I), provient de chez Amersham (Oakville, Ontario, Canada), tandis que l'iode-131 (Na^{131}I) et l'indium-111 (^{111}In) provient de chez NEN Dupont (Pointe-Claire, Québec, Canada). Le détecteur radioactif, un compteur à puits à cristaux de NaI(Tl) jumelé analyseur simple-canal, Ortec 449-2, débitmètre "log-lin" à fenêtre multiple, jumelé au HPLC, est d'une conception locale. Le compteur gamma (g) est un compugamma LKB WALLAC 1282.

4. Peptides

L'analogue de la somatostatine, le MK-678, provient de chez Merck-Frosst (Kirkland, Québec, Canada), tandis que l'Hexarelin, un GHRP, et l'Antarelix, un analogue de la LHRH, sont une gracieuseté d'Europeptide (Argenteuil, France).

II.A La Chimie

II.A.1 Iodination du MK-678

A. Principe

L'iodination se produit par l'oxydation d'un groupement aromatique qui s'effectue par un agent oxydant, tel la chloramine-T (N-chloro-p-toluènesulfonamide) ou l'iodogène (1,3,4,6-Tetrachloro-3a-6a-diphenylglycoluril), capturant ainsi un atome d'hydrogène. Cette dépouille laisse sur le groupement cyclique une charge positive venant d'une déficience électronique. Le NaI, dans la solution environnante, subit le même sort et forme de l'iode moléculaire (I₂). Cette forme moléculaire d'iode, en solution aqueuse, est en équilibre avec une autre forme appelée iode hydraté (H₂OI⁺) (fig. 13) qui peut aussi réagir avec le groupement phényl cible oxydé pour donner l'iodination recherchée. Au point de vue des acides aminés, le substrat aromatique est le plus souvent la tyrosine, mais l'iodination peut se faire aussi sur l'histidine, la tryptophane, la cystéine et la méthionine (Alexander et al., 1973).



Figure 13. Formule de la réaction de l'iode moléculaire dans une solution aqueuse.

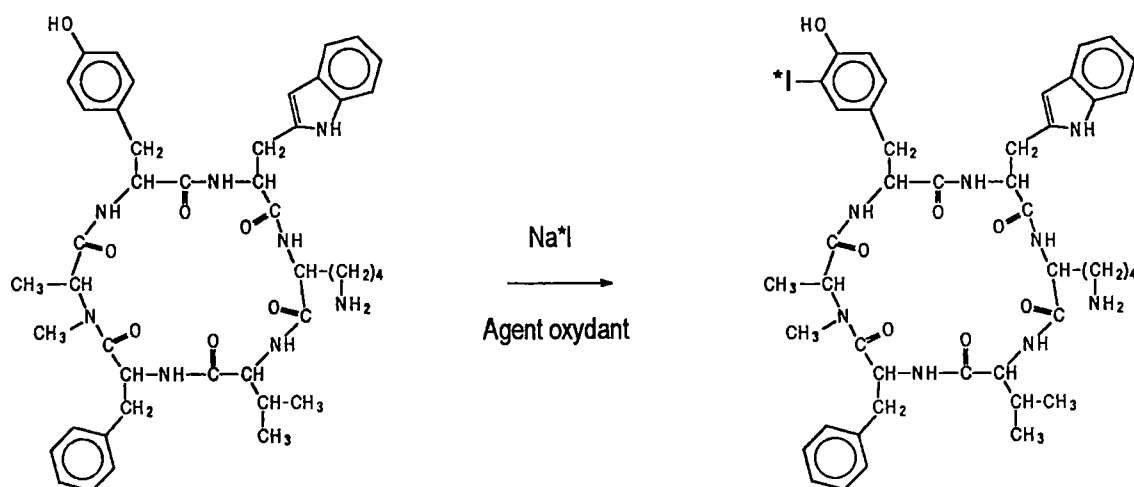


Figure 14. Structure et réaction du MK-678 à l'iode radioactive en présence d'un agent oxydant (Chloramine-T).

B. Technique

i) Chloramine-T:

A une solution de MK-678 (26 μg , 0.03 μmole) dans 26 μl d'eau a été ajouté de la chloramine-T (64 μg , 0.28 μmole) dans 6.4 μl d'eau, un tampon phosphate pH 7.5 1M (10 μl) et de l'iodure-125 de sodium (500 μCi) dans 25 μl d'eau pH 9. La solution a été brassée pendant 10 minutes à 25 °C et ensuite arrêtée avec 1 mg (4 μmole) de thiosulfate de sodium dans 100 μl d'eau. Ensuite, la mixture a été injectée dans un HPLC (C-18, Ultrasphère ODS, 5 μm , Beckman), et éluée à 1 ml par minute avec de l'eau (0.05% TFA) (sol.A) et de l'acétonitrile (0.05% TFA) (sol.B) avec le gradient suivant: 0-10 min. (100% sol.A), 10-40 min. (gradient), 40 min. et plus (100% sol.B). Le détecteur u.v. a été ajusté pour détecter à 279 nm à une amplitude de 0.02 aufs, et le détecteur radioactif, pour une détection énergétique du Na^{125}I de 35 KeV à une intensité de 3×10^3 . Les deux détecteurs donne leur détection sur une table graphique à deux traceurs. L'analogue marqué a été collecté, évaporé sous un jet d'azote et dilué dans un volume précis (tout dépendant des besoins de l'étude) de PBS (pH 7.4) (pour les besoins donnés d'une étude) et trois échantillons de 1 % de la solution ont été comptés par un compteur à scintillation.

II.A.2 Synthèse de L'Hexarelin iodé

A. Principe

(voir section II.A.1)

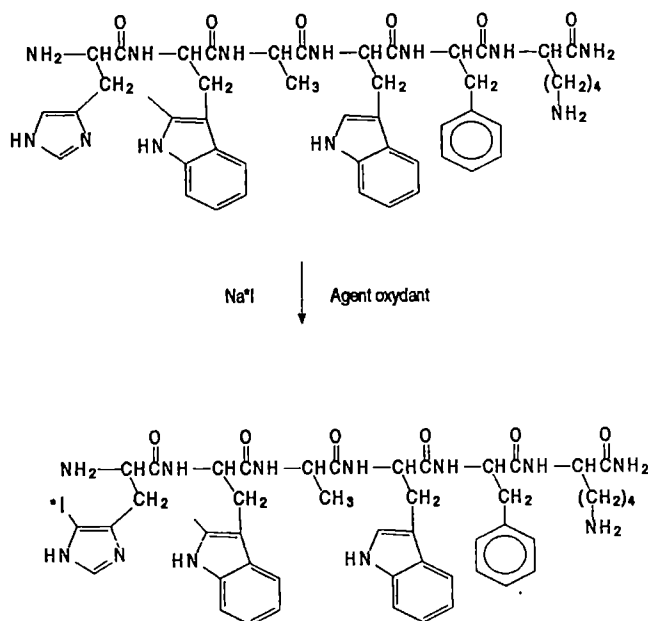


Figure 15. Structure et réaction de l'Hexareline à l'iodure-125 en présence d'un agent oxydant; la chloramine-T.

B. Technique

i) Chloramine T:

A une solution d'Hexarelin (26 μg , 0.03 μmole) dans 26 μl d'eau a été ajouté de la chloramine-T (64 μg , 0.28 μmole) dans 6.4 μl d'eau, un tampon phosphate pH 7.5 1M (10 μl) et de l'iodure-125 de sodium (500 μCi) dans 25 μl d'eau pH 9. La solution a été brassée pendant 10 minutes à 25 °C, et ensuite arrêté avec 1 mg (4 μmole) de thiosulfate de sodium dans 100 μl d'eau. Ensuite, la mixture a été injectée dans un

HPLC (C-18, Ultrasphère ODS, 5 μ m, Beckman), et éluée à 1 ml par minute avec de l'eau (0.05% TFA) (sol.A) et de l'acétonitrile (0.05% TFA) (sol.B) avec le gradient suivant: 0-10 min. (100% sol.A), 10-40 min. (gradient), 40 min. et plus (100% sol.B). Le détecteur u.v. a été ajusté pour détecter à 279 nm, et le détecteur radioactif, pour une détection énergétique du Na¹²⁵I de 35 kev. Les deux détecteurs ont donné leur détection sur une table graphique à deux traceurs. Les pics radioactifs élués à 30.4 et 31.2 minutes ont été collectés, évaporés sous un jet d'azote, et dilués dans 2 ml de PBS pH 7.4 et des échantillons, en triplicata, de 1 % de la solution ont été comptés à l'aide d'un compteur à scintillation.

II.A.3 Synthèse de l'Antarelix iodé

A. Principe

(voir section II.A.1)

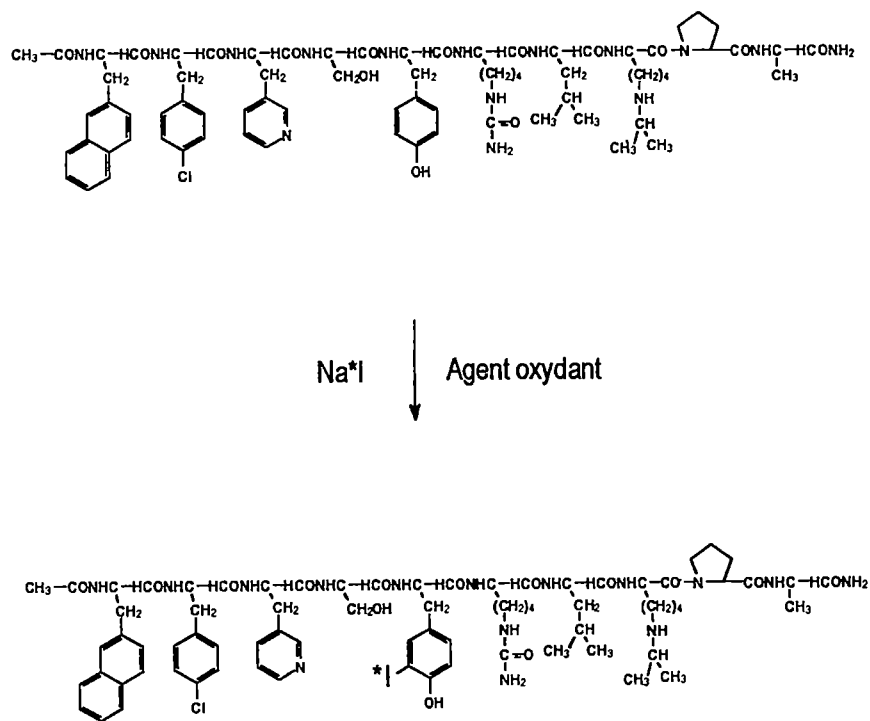


Figure 16. Structure et réaction de l'Antarelix à l'iode-125 en présence d'un agent oxydant; l'iodogène ou la chloramine-T.

B. Technique

i) Chloramine-T

A une solution d'Antarelix (44 μg , 0.03 μmole) dans 44 μl d'eau a été ajoutée de la chloramine-T (64 μg , 0.28 μmole) dans 6.4 μl d'eau, un tampon phosphate pH 7.5 1M (10 μl) et de l'iodure 125 de sodium (500 μCi) dans 25 μl d'eau pH 9. La solution a été brassée pendant 10 minutes à 25 °C, et ensuite arrêtée avec 1 mg (4 μmole) de thiosulfate de sodium dans 100 μl d'eau. Ensuite, la mixture a été injectée dans un HPLC (C-18, Ultrasphère ODS, 5 μm , Beckman) et éluée à 1 ml par minute avec de l'eau (0.05% TFA) (sol.A) et de l'acétonitrile (0.05% TFA) (sol.B) avec le gradient suivant: 0-10 min. (100% sol.A), 10-40 min. (gradient), 40 min. et plus (100% sol.B). Le détecteur u.v. a été ajusté pour détecter à 267 nm et le détecteur radioactif, pour une détection énergétique du Na^{125}I de 35 keV. Les deux détecteurs ont donné leurs détections sur une table graphique à deux traceurs. Le Na^{125}I a été élué à 2.6 min., la chloramine-T à 2.0 min., l'Antarelix seul à 26.8 min. et l'Antarelix marqué à 32.4 min. Ces derniers pics ont été collectés, évaporés sous un jet d'air et dilués dans 2 ml de PBS pH 7.4 et trois échantillons de 1 % de la solution ont été comptés avec un compteur à scintillation. Le rendement a été de 21% (104 μCi).

ii) Iodogène

Dans des tubes eppendorf, 1 ml d'une solution de 1 mg/ml d'iodogène (1,2,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenyl glycoluril) dans du chloroforme a été agitée vigoureusement et le chloroforme évaporé sous un jet d'azote. Dans un tube recouvert d'une mince couche de l'agent oxydant, une solution (60 μl) d'eau et de tampon phosphate 1M (pH ~ 7.5) (v/v) contenant l'Antarelix (30 μg , 0.02 μmole) et de l'iodure-125 de sodium (500 μCi) dans 30 μl d'eau pH 9, ont été ajoutés. La solution a été brassée pendant 10 minutes à 25 °C. La mixture a été injectée dans un HPLC et éluée à 1 ml par minute avec de l'eau (0.05% TFA) (sol.A) et de l'acétonitrile (0.05% TFA) (sol.B) avec le gradient suivant: de 25 à 40% de la sol.B sur 60 minutes. Le détecteur u.v. a été ajusté pour détecter à 230 nm et ce signal a été enregistré sur une table graphique. De

plus, pour bien isoler chaque produit, des échantillons de 0.5 ml ont été collectés à intervalles de 30 secondes. Les fractions ont ensuite été lues sur un spectrophotomètre pour une détection u.v. à 280 nm (longueur d'onde d'absorption maximale de la phénylalanine), et des échantillons de ces fractions ont été comptés en triplicata à l'aide d'un compteur à scintillations. Le pic majeur élué à 47.5 minutes a été collecté, évaporé sous un jet d'azote (après addition de 100 μ l de PBS), et gardé à 4 °C sous forme de sel. Avant utilisation, le produit a été dissout dans un volume connu d'eau, et trois échantillons de 1 % de la solution ont été comptés avec un compteur à scintillation.

II.A.4 [^{111}In]-DTPA-Hexarelin

A. Principe

L'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) sert de chélateur à l'Hexareline pour lui attacher l'isotope radioactif, l'indium-111. Le DTPA doit d'abord être jumelé au peptide avant d'y insérer l'indium. Le DTPA possède cinq groupes carboxyl (fig. 17) qui peuvent réagir avec des groupes amines retrouvés sur le peptide. Cette réaction est spontanée dans un solvant organique lorsque le DTPA est sous forme dianhydrique.

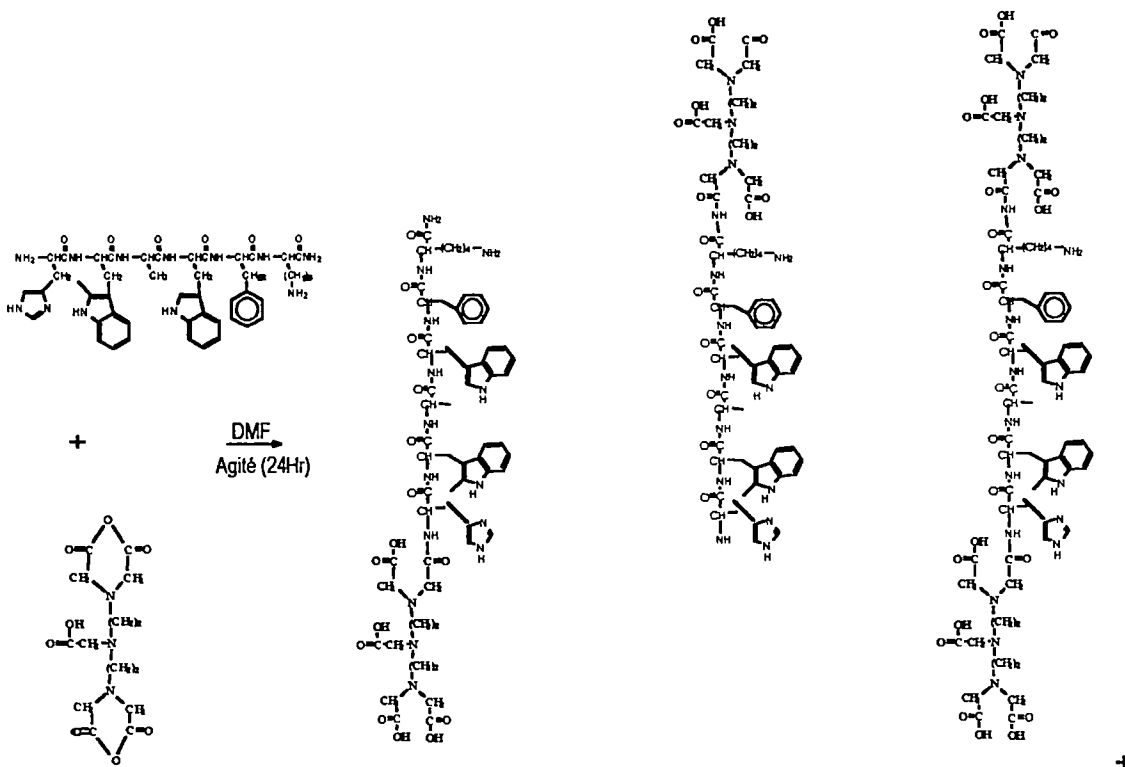


Figure 17. Structure et réaction de l'Hexareline à l'acide diéthylenetriamine pentaacétique (DTPA) dianhydrique en solution de diméthylformamide (DMF). Trois produits majeurs hypothétiques. D'autres peuvent être obtenus incluant des chaînes continues de peptides et de DTPA.

B. Technique

Dans un tube de borosilice, 500 μg (0.56 μmole) d'Hexareline dans 100 μl de DMF ont été insérés et un excès de DTPA dianhydrique (10x; 2.0 mg) a été ajouté. La solution a été laissée pendant 24 heures à TPN (20 - 25 °C; 1 atm.) en agitant constamment. La solution de DMF a ensuite été évaporée sous un jet d'air et resolubilisée dans une solution d'eau. La solution a été filtrée sur un filtre de 0.45 μm Millex-HV de chez Millipore (Bedford, MA, USA). Le filtré a ensuite été réduit de volume par évaporation et injecté sur HPLC. Les fractions ont été récoltées sous un gradient de 20 à 50% acétonitrile (0.05% TFA) dans de l'eau (0.05% TFA) sur 60 minutes. Les pics majeurs ne correspondant pas à l'Hexareline non réagi ont été réévaporés (pour éliminer le solvant organique et le TFA) et resolubilisés dans 200 μl de tampon acétate (10 mM; pH 6.5) pré-traité au Chelex. L'indium-111 (500 μCi) a ensuite été ajouté et la solution a été

laissée de 30 minutes à 2 heures en brassant de temps en temps. Le mélange a été injecté sur HPLC et les fractions radioactives ont été récoltées. Pour la dernière fois, les fractions ont été évaporées et resolubilisées dans du PBS (pH 7.5) (10-30% DMF) prêts pour injection.

II.A.5 Synthèse du complexe Hexarelin-B&H

A. Principe

Le substrat de Bolton et Hunter (B&H) fournit une alternative pour le radiomarquage des peptides, où la tyrosine est absente de la séquence ou parce qu'elle est importante pour l'activité biologique (Gaudriault et Vincent, 1992). Le produit B&H possède un groupement réactif que l'on nomme *ester activé*, qui peut se jumeler à des groupements aminés souvent retrouvés chez les peptides (lysine). Le groupement B&H doit être iodé avant même que son insertion soit effectuée dans une molécule.

sous un gradient de 0 à 40% de la sol. B (100% acétonitrile; 0.05% TFA) dans la sol. A (100% H₂O; 0.05% TFA) sur les 40 premières minutes, et de 40 à 60% de sol. B dans la sol. A sur les 10 dernières minutes. Finalement, les fractions radioactives ont été récoltées, évaporées et resolubilisées dans de l'eau ou PBS.

II.A.6 Hexarelin-Dextran

A. Principe

Le dextran (Dx) est une molécule possédant des groupements hydroxyls qui, par la réaction au periodate de sodium, deviennent des aldéhydes (1) prêtes à réagir aux amines libres disponibles sur le peptide (2) et former un complexe Hexarelin-Dextran stable après réaction au cyanoborohydrure de sodium (3.) (fig. 19). Étant donné que le dextran est bien connu pour sa facilité à lier le ^{99m}Tc, le complexe peptidique peut lui aussi être lié à cet isotope et faire du produit Hexareline-Dextran, un agent d'imagerie.

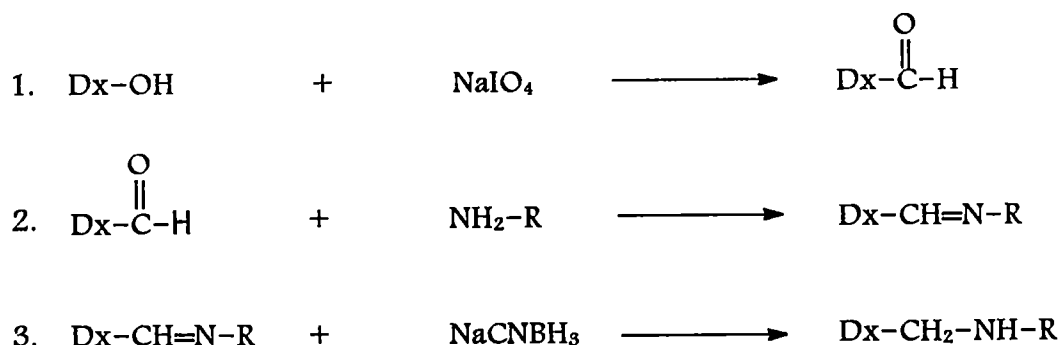


Figure 19. Schéma de la transformation du dextran à la forme liée au peptide. Formation des groupements aldéhydes (1); réaction des aldéhydes aux amines peptidiques (2); réduction des doubles liens et formation d'un produit stable (3).

B. Techniques

A une solution de 1 mM (10 mg) de dextran T-10 (Pharmacia Biotech) dans 1 ml de tampon acétate (0.1 M; pH 5.5) a été ajoutés 6 mg (28.1 μ mole) de periodate de sodium. La mixture a été incubée 24 heures à TPN dans le noir. Le mélange a ensuite été passé sur une colonne PD-10 (Séphadex G-25) équilibrée au préalable avec 0.2M d'un tampon phosphate (pH 6.0). La fraction 4 contenant le plus de dextran (fig. 31) a été incubée à 1 mg d'Hexareline dans 1 ml de tampon phosphate (pH 6.0). Une seconde incubation de 24 heures, sous agitation continue à 5 °C dans la noirceur, a été appliquée. À la fin de la période d'incubation, 1.8 mg de cyanoborohydrure de sodium dans 100 μ l de tampon phosphate (0.2M; pH 6.0; 0.1 M de glycine) a été ajouté et laissé pendant 3 heures supplémentaires (traitement réductif). La mixture finale a été purifiée sur une colonne PD-10 dans un tampon phosphate (0.2M; pH 6.0). Des fractions de 1 ml ont été récoltées et chaque fraction a été analysée pour sa densité optique à 280 nm sur un spectrophotomètre Hitachi U-2000 (Tokyo, Japon) et sur plaque chromatographique à couche mince (TLC) brûlée à l'acide sulfurique et cuit sur plaque chauffante.

II.A.7 Synthèse du complexe ^{111}In -Antarelix

A. Principe

L'indium-111 a besoin de 3 groupements aminés (3 azote "N") pour obtenir une liaison solide. Le N-terminal de l'Antarelix possède ces trois groupements aminés qui, sous une forme tridimensionnelle, peut former une structure pouvant recevoir l'indium. Le peptide doit donc être poussé à former la structure désirée pour y insérer l'isotope lors de la période réactive.

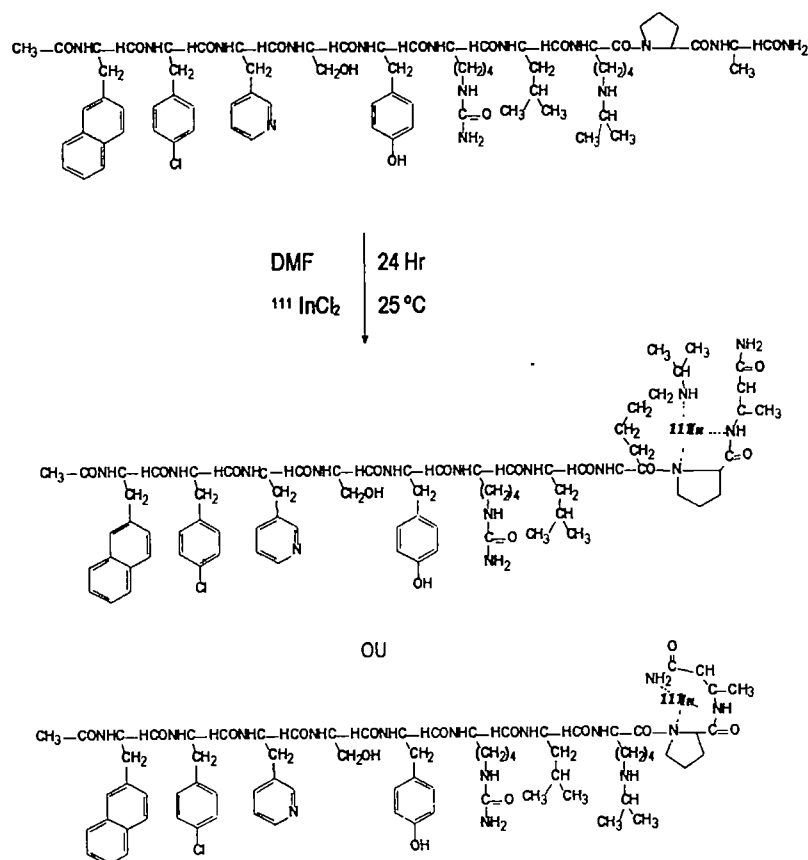


Figure 20. Modèle du marquage direct de l'Antarelix à l'indium-111.

B. Technique

À 500 μCi d'indium-111 évaporé sous azote, 100 μl (100 μg) d'Antarelix dans du DMF ont été ajoutés. La réaction a été laissée à TPN pendant 24 heures, elle a ensuite été évaporée et resolubilisée dans de l'eau pour fin de purification sur HPLC sous un gradient de 20 à 60% d'acétonitrile (0.05% TFA) dans de l'eau (0.05% TFA) sur 60 minutes. Les pics radioactifs ont été récoltés, évaporés et resolubilisés dans un solvant injectable in vivo (eau ou mélange d'eau et de DMF).

II.B La biologie

1. Culture cellulaire

Dans des flacons de culture cellulaire ayant une surface de 75 cm², des cellules EMT-6 ont été implantées avec 10-15 ml de milieu de culture cellulaire Waymouth complet (10% NCS, 1% pénicilline, 1% glutamine). Une fois les flacons à confluences, le milieu de culture cellulaire a été retiré par succion de vacuum, les cellules ont été rincées une à deux fois avec du PBS et ensuite traitées dans 5-10 ml de versène (PBS et 10mM EDTA). Après incubation de 10-15 minutes à 37 °C, la solution de versène a bien été agitée à l'aide d'une pipette afin de décoller au maximum les cellules de la surface des flacons. La solution cellulaire a ensuite été transférée dans un tube à culture cellulaire de 50 ml, centrifugée à ~500 g pendant 10 minutes, rincée de nouveau avec un volume égal de PBS, recentrifugée et un volume calculé de milieu de culture cellulaire complet a été ajouté afin d'obtenir la concentration de cellules voulue pour les besoins de l'expérience.

Dans le cas des cellules MCF-7, le milieu utilisé a été le MEM (minimum essential medium) complété de 10 % de NCS, 1 % de pénicilline, 1 % insuline, 1 % pyruvate de sodium.

2. Étude pharmacocinétique

Les souris ont été inoculées à raison d'une injection par cuisse de 2×10^5 (50 μ l) cellules tumorales EMT-6, au niveau intradermique. Après un minimum de dix jours d'incubation, les souris ont été injectées avec 200 μ l soit de ¹²⁵I-MK-678 (172 μ Ci), de ¹²⁵I-Hexarelin (0.13 μ Ci), de ¹²⁵I-Antarelix (1.4 μ Ci), ou de [¹¹¹In-DTPA]-Hexarelin (20-101 μ Ci) par la veine caudale. Lors de la biodistribution, un nombre égal de souris a été sacrifié à différents intervalles de temps (passant de 30 min. à 24 heures) afin d'identifier les tissus cibles du produit marqué par rapport au temps.

Pour ce qui est de la clairance sanguine, d'autres souris ont aussi été injectées avec 200 μ l de produit radioactif. Des échantillons sanguins ont été prélevés après l'injection au niveau occipital à l'aide de microcapillaires, à des temps variants de 2 min. à 24 heures. Ces derniers ont été centrifugés, le plasma séparé, pesé et compté pour la contenance en radioactivité.

De plus, pour mesurer la cinétique d'excrétion des peptides radioactifs, d'autres souris ont encore une fois été pesées et injectées avec la forme radioactive du produit. Elles ont ensuite été placées individuellement dans des cages où du papier absorbant recouvert de moustiquaire servaient respectivement de collecteurs pour l'urine et pour les selles. Le papier a ensuite été récolté et introduit dans des tubes. De plus, les selles ont été récoltées et elles aussi, insérées dans des tubes. Le tout a ensuite été compté par le compugamma (fig. 21). Cette mesure a été répétée à 24, 48 et 72 heures après l'injection pour un même animal (n = 3 ou 4).

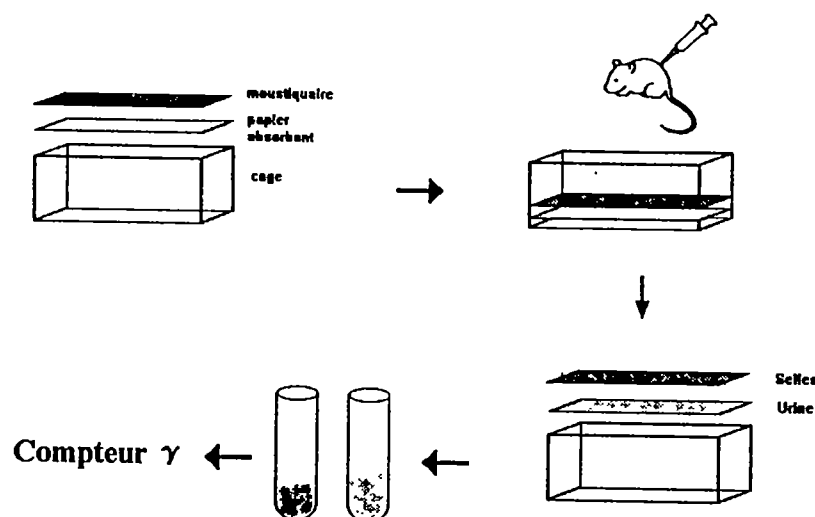


Figure 21. Schéma de la méthode élaborée pour les études d'excrétion chez la souris.

3. Étude *in vitro*

i) Liaison des récepteurs sur cellules vivantes

L'analogue iodé de la LHRH a été testé en pètri pour son activité à se lier spécifiquement aux récepteurs de GnRH. Pour chaque essai, le temps d'incubation, la quantité d'analogue iodé et la quantité de cellules, ou la concentration de protéines, ont été déterminés afin d'optimiser les résultats. La convention établie a été d'utiliser en moyenne: 10^6 cellules, 10^6 cpm et de pratiquer les tests à 4°C pendant 90 minutes. Pour les essais en pètri, les cellules à 80-90% confluentes ont été rincées 2 fois avec du PBS (pH ~7.4) et une troisième fois avec du Hank's Balanced Salt Solution (pH ~7.4; 20 mM HEPES; 2% BSA) (HBSSa). Après avoir bien retiré la solution de rinçage par vacuum, 1 ml d'une solution d'incubation comprenant l'analogue iodé, 0.2% BSA, et la présence ou non de l'analogue non iodé dans du HBSS (pH ~7.4; 20 mM HEPES) a été ajouté dans les pètris. La présence de l'analogue non iodé correspond aux études de liaison non spécifique (NS), et l'absence d'analogue non iodé correspond aux études de liaison spécifique (Bt). Une fois la période d'incubation terminée, 2 ml de la solution de rinçage HBSSa ont été rajoutés, et retirés par vacuum, pour terminer la réaction. Les pètris ont été rincés une dernière fois avec le même volume, et cette dernière solution a aussi été retirée par vacuum. Pour récolter les cellules, un bâtonnet de caoutchouc a été utilisé pour gratter et décoller les cellules des plaques. Une fois grattés, les pètris ont ensuite été rincés avec 1 ml de HBSSa ainsi que le bâtonnet et la solution de cellules récoltées à l'aide d'une micropipette 1000. La solution a été transférée dans des tubes eppendorf (5 ml) en polypropylène, centrifugée à ~12000 g pendant 5-10 minutes, et comptée sur compteur gamma. Tous les tests ont été faits en triplicata.

ii) Liaison aux récepteurs pour les fractions membranaires

La méthode utilisée est semblable à celle retrouvée en i). Au lieu d'utiliser des cellules vivantes, ces dernières ont été perméabilisées par la méthode du gel-dégel ou de celle de l'homogénéisateur Dounce ou

des deux ensembles. Le gel-dégel consiste à refroidir les cellules instantanément à -180 °C (dans de l'azote liquide) et de les réchauffer à 37 °C immédiatement après cristallisation complète. Cette manipulation a été répétée de 3 à 4 fois et le produit a ensuite été centrifugé. La méthode de l'homogénéisateur Dounce consiste à forcer les cellules à se briser par la formation d'un semi-vide et par la force mécanique obtenue lors du passage des cellules entre les deux parois de verre du piston. Pour une meilleure optimisation du système, les deux méthodes peuvent être couplées et optimisées davantage par l'utilisation d'une solution hypotonique. Donc, les cellules sont rincées avec du PBS, centrifugées, resuspendues dans un tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7.6; 0.3M sucrose; 1 mM MgCl₂; 1 mM dithiothreitol; 1 mM PMSF) et soumises au traitement du gel-dégel. La solution cellulaire a immédiatement été incorporée dans un homogénéisateur Dounce refroidi entre 0 et 4 °C et soumis à 8 coups de piston. La solution a ensuite été insérée dans un tube à ultracentrifugeuse et centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes afin de séparer les débris cellulaires du cytosol. Le surnageant a alors été retiré et le culot resuspendu dans 10 ml de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7.6; 0.3M sucrose; 1 mM MgCl₂; 1 mM dithiothreitol) et ultracentrifugé à 30000 g pendant 20 à 30 minutes. Le surnageant a de nouveau été retiré et les restes cellulaires ont été resuspendus une dernière fois dans le même tampon. La concentration de protéines a été déterminée par la méthode Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada), et les fractions membranaires ont été séparées en échantillons de 0.1 ml et congelés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

Dans chaque essai, de 50-70 µg de protéines ont été utilisés dans un volume final de 350 µl dans des tubes eppendorfs en polypropylène traités une heure au préalable avec une solution de 1-2% BSA. Les essais B_t et NS ont été faits à 4 °C, ou à la température de la pièce, pendant 90 minutes dans une solution Tris-HCl 10 mM (pH 7.6; 0.3M sucrose; 1 mM MgCl₂; 1 mM dithiothreitol). Après l'incubation, les tubes ont été centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes, le surnageant retiré par vacuum, et les culots comptés sur compteur gamma. Les essais ont tous été faits en triplicata.

iii) Études radioimmunologiques (RIA)

Tous les tests de RIA ont été faits par la méthode de Roumi *et al.* (1995) développée dans le laboratoire du Dr. Huy Ong à la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal.

II.C Autres

II.C.1 Stockage des fractions purifiées par HPLC

Une fois la fraction désirée récoltée, 100 ml de PBS ont été ajoutés à la solution et cette dernière a ensuite été placée sous un jet d'azote (ou d'argon) afin d'assécher le liquide dans lequel se trouve le produit (habituellement eau, acétonitrile et acide trifluoroacétique). Une fois le volume évaporé, le produit lié au sel du PBS peut être gardé à 4 °C pendant plusieurs semaines, voir même des mois.

Lors de l'utilisation du produit, le complexe a été dissout dans un volume connu d'eau, ou dans un mélange d'eau et d'une solution organique (DMF, CH₃CN) chez certains produits plus hydrophobes, tel l'Hexarelin-DTPA.

II.C.2 Stabilité des produits en solution

Afin de vérifier si les produits en solution dans la chambre froide peuvent être gardés un certain temps sans qu'il y ait dégradation chimique ou enzymatique, les produits ont été soumis à un test sur chromatographe à couche mince.

Technique

Un échantillon de la fraction a été appliquée, à l'aide d'un capillaire de verre, sur une plaque chromatographique à couche mince (TLC). Une fois l'échantillon bien séché, le TLC a été placé dans un contenant où se trouve la solution de migration (PBS). Lorsque celle-ci a été terminée, le TLC a été coupé en plusieurs endroits et les fractions ont été comptées individuellement dans un compteur gamma. La stabilité du produit a été déterminée grâce à la position où l'on retrouve la radioactivité, généralement différente entre celles liées et celles complexées à une molécule quelconque, toujours relativement aux solution de migration utilisées (fig. 22).

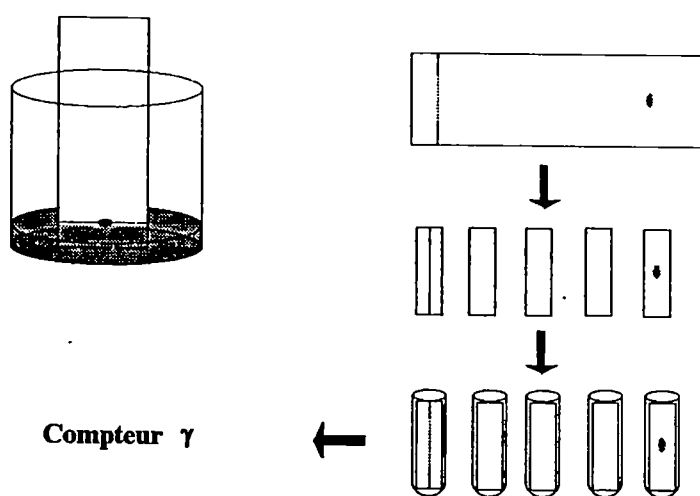


Figure 22. Schéma de la méthode d'analyse de chromatographie à couche mince.

III. Résultats

III. Résultats

III.A Études chimiques

Purification par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

La chromatographie a été effectuée par la méthode analytique, sur une colonne C-18 delta-pack de chez Waters (Milford, MA, USA) (sauf dans III.A.1, III.A.2 et III.A.5, où la chromatographie a été effectuée sur une colonne C-18, Ultrasphere ODS, 5 μ m, de chez Beckman (Mississauga, Ontario, Canada)) en présence d'une concentration de 0.05% d'acide trifluoroacétique (TFA), échelonnée sur une période d'environ soixante minutes. Un détecteur d'absorption UV/VIS et un détecteur radioactif ont été jumelés au système de HPLC afin d'analyser les produits obtenus.

III.A.1 Purification du MK-678 iodé

Le MK-678 a été purifié par HPLC avec le gradient d'acétonitrile et d'eau dans (0.05% TFA) comme suit: 0-10 min., 100 % eau; 10-40 min., gradient de 1 % acétonitrile par minute; 40-60 min., 100 % acétonitrile. La détection optique a été effectuée dans l'UV à une longueur d'onde de 279 nm, à une intensité de 0.02 aufs et dans le spectre radioactif, à une sensibilité égale à 3×10^3 . Les pics A, B, C et D correspondent respectivement à la chloramine-T, au MK-678, au Na^{125}I et au ^{125}I -MK-678 (fig. 23). Le Na^{125}I a été élué à 3.2 min., la chloramine-T à 9.4 min., MK-678 seule à 26 min. et le MK-678 marqué à 30.4 min. Le rendement retrouvé de l'iodination au MK-678, sur la quantité initiale d'iode, est de 16% (82 μCi).

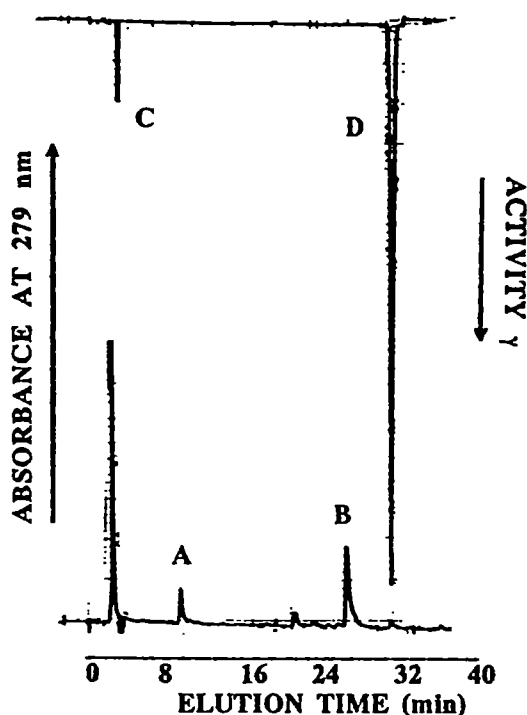


Figure 23. Chromatogramme de HPLC du MK-678 et de ses dérivés iodés.

III.A.2 Purification de l'Hexarelin iodé

La chromatographie (fig. 24) a été effectuée à l'aide d'une solution A (100% eau; 0.05% TFA) et d'une solution B (100% acétonitrile; 0.05% TFA). L'élution a été faite comme suit: 0-10 min., 100% sol. A; 10-40 min., gradient de 1% sol. B par min.; 40-60 min., 100% de la solution B. Le débit était de 1 ml/min. La détection a donné quatre pics majeurs soit, en A, la chloramine-T (2.4 min.) et autres rebuts comme les sels; en B, l'absorption UV de l'Hexarelin (32.8 min.) et des autres formes d'Hexarelin (vérification de la pureté initiale de l'Hexareline a été faite au préalable); en C, la radioactivité détectée du Na¹²⁵I (3.2 min.); et en D, la radioactivité détectée de différents produits marqués obtenus (30.4 et 31.2 min.). Le rendement retrouvé de l'iodination à l'Hexareline, sur la quantité initiale d'iode, est de 6% (30 μ Ci). Les résultats représentés en B pourraient indiquer une dégradation du peptide. La discussion est d'ailleurs axée sur cette possibilité.

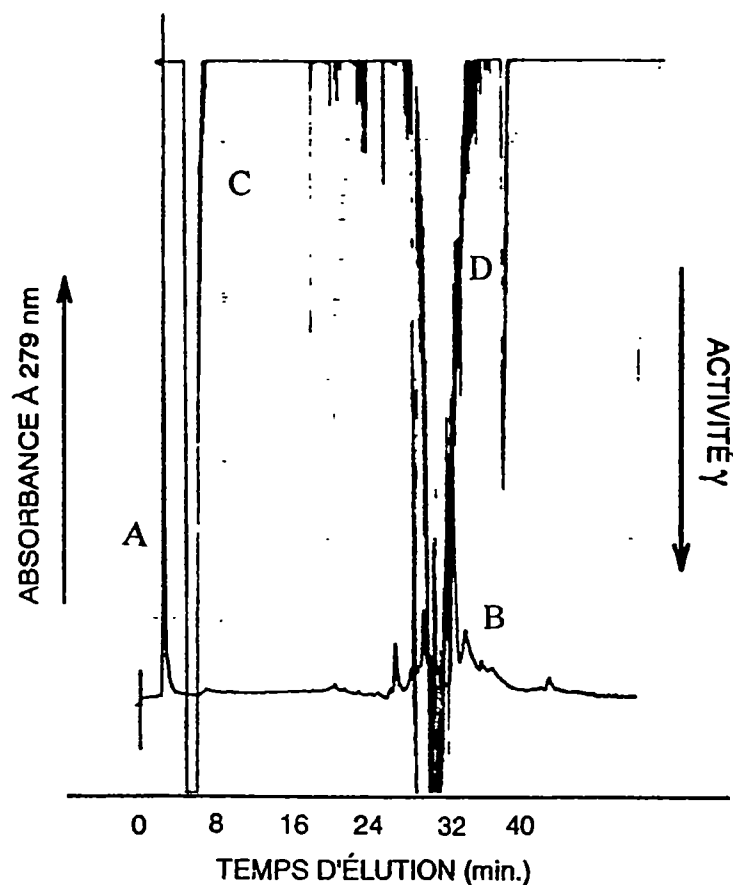


Figure 24. Chromatogramme de HPLC de l'Hexarelin et de ses dérivés iodés.

III.A.3 Purification de l'Antarelix iodé à l'iodogène

Les fractions récoltées à toutes les 30 secondes (fig. 25) ont toutes été lues sur un spectrophotomètre, pour la détection optique et des échantillons de 1 % (en triplicata) ont été comptés sur un compteur à scintillation pour la détection radioactive. Le Na^{125}I a été élué à 3.5 minutes, l'Antarelix seul à 38 minutes, et l'Antarelix marqué à 47.5, 51 et 54 minutes après injection de la solution de réaction dans le système.

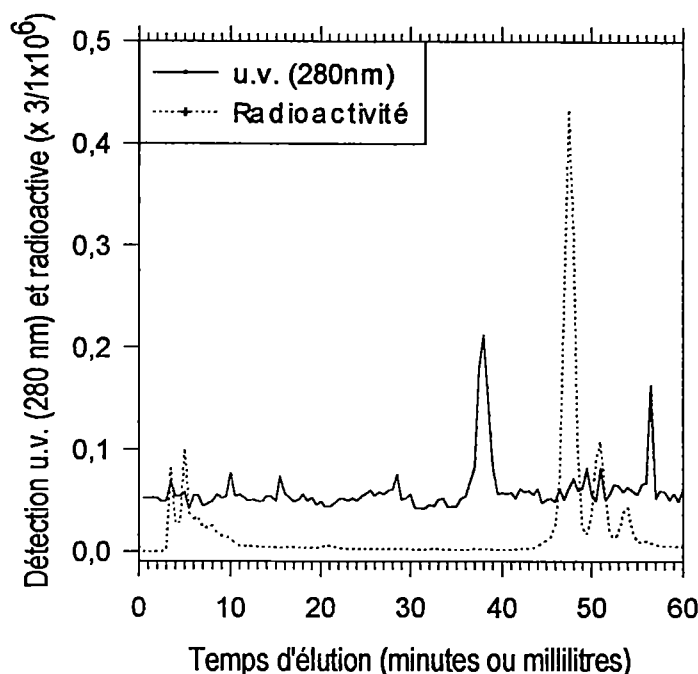


Figure 25. Chromatographie liquide de haute performance (HPLC) de l'Antarelix et de ces analogues iodés. Éluion de 25% à 40% acétonitrile (0.05% TFA) dans eau (0.05% TFA) sur 60 minutes. Débit de 1 ml/minute. Des fractions ont été récoltées à chaque 30 secondes et diluées dans 0.5 ml d'eau.

Trois pics radioactifs ont été détectés très près l'un de l'autre. Ces pics peuvent représenter la forme monoiodée du peptide (le pic majeur; 47.5 min.), la forme diiodée (le suivant; 51 min.), et un marquage tertiaire inconnu qui peut représenter l'iodination à un autre site qu'à la tyrosine, ou une conformation tridimensionnelle de plus haute énergie autre que celle retrouvée habituellement. Étant donné que les conditions favorisent la monoiodination sur la diiodination (voir section IV), le plus important des deux pics est, sans doute, la forme monoiodée de l'Antarelix. Le rendement de l'iodination de l'Antarelix sur la quantité d'iode initiale était de 28% (140 μ Ci). En moyenne le rendement était de 25% après 10 minutes de réaction, passant à 33% après 60 minutes avec une nette augmentation de la quantité de produit secondaire diiodé.

III.A.4 Purification de l'[¹¹¹In]-DTPA-Hexarelin

i) Hexarelin-DTPA avant radiolisation

Le chromatogramme (fig. 26) montre bien les produits formés après réaction de l'Hexarelin et du DTPA dans le DMF. L'Hexarelin non réagi a été élué à 24 min. et le(s) produits majeurs ont été retrouvés à 31 min. et 43 min. La fraction éluée à 31 minutes, représente deux pics superposés (voir section suivante), qui, selon des critères de dimension et de probabilité de liaison, sont les formes monoliées. Celle à 43 minutes représente, selon les mêmes critères, la forme diluée. Grâce à l'excédant du substrat DTPA, les autres possibilités de réaction (+) ont grandement été diminuées. La forme majoritaire est traitée de façon à être utilisée pour les études biologiques.

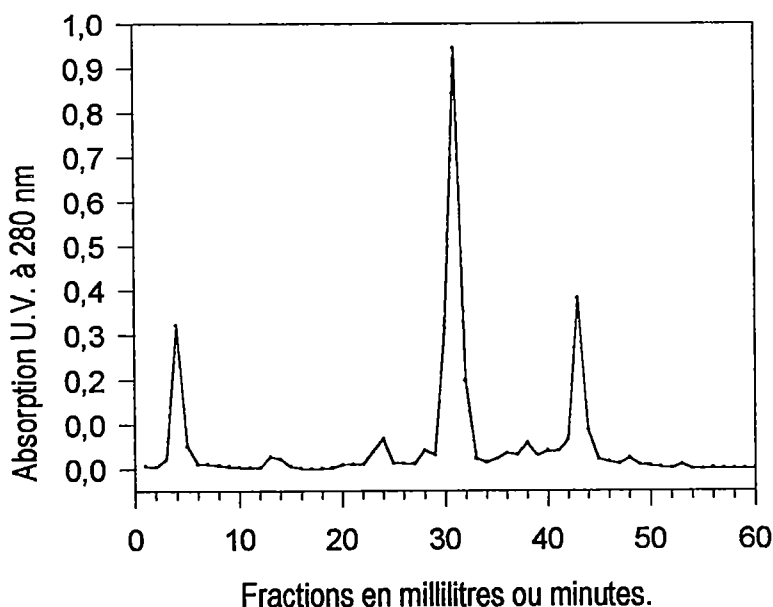


Figure 26. HPLC de l'Hexarelin lié au DTPA effectué sur 60 minutes, de 20% à 50% acétonitrile (0.05% TFA) dans de l'eau (0.05% TFA). Les fractions réagies et récoltées ont été retrouvées à 31 minutes (1^{er} pic majeur) et à 43 minutes (2^e pic majeur). L'Hexarelin non réagi a été retrouvé à 24 minutes.

ii) Hexarelin-[¹¹¹In-DTPA] après radiolisation

Fraction 1

Le marquage à l'indium-111 de la fraction 1 (31 minute) s'est fait avec un grand rendement (~43%). Le chromatogramme du HPLC (fig. 27) montre très bien la liaison de l'indium radioactive au complexe Hexarelin-DTPA. Les deux pics radioactifs montrent un dédoublement de la fraction récoltée. Cette dualité a été confirmée par une seconde chromatographie plus étirée dans son gradient (20 à 50% de la sol. B sur 100 minutes; résultats non présentés) et signifierait la présence de deux isomères où la molécule de DTPA serait liée, en un cas, à la position α (pic radioactif mineur), et hypothétiquement dans l'autre, à la position ϵ (pic radioactif majeur) (Langone, 1989). Le plus important des deux pics est sans doute celui qui indique le produit du peptide lié au DTPA à la position ϵ (la lysine), et l'autre, celui lié en position α (la terminaison amine).

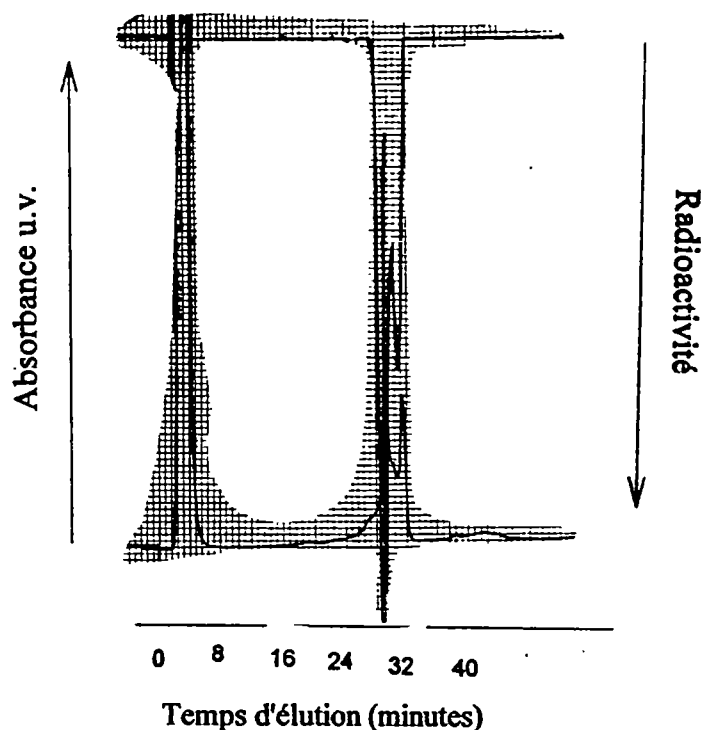


Figure 27. Chromatogramme du marquage à l'indium 111 du pic 1 élué à 31 minutes.

Fraction 2

La liaison radioactive à la fraction 2 (43 minutes) a, ici aussi, été très appréciable (rendement ~ 48%) et avec une concentration radioactive sensiblement égale à celle obtenue pour la fraction 1 (fig. 28). Dans ce cas si, la forme chélatée du peptide est traitée comme celle possédant deux DTPA par molécule. Ce qui pourrait expliquer le bas niveau d'absorption u.v. détecté malgré la forte radioactivité présente.

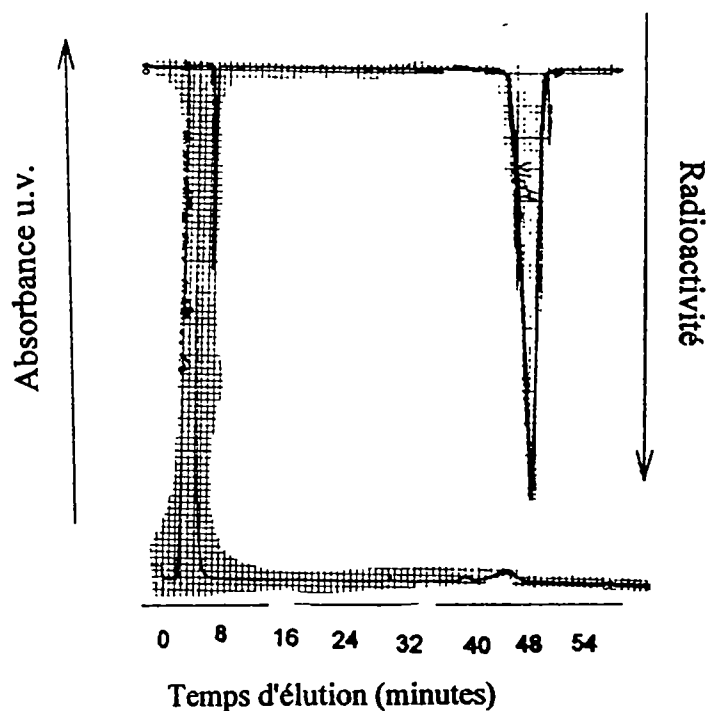


Figure 28. Chromatogramme du marquage à l'indium-111 du pic 2 élué à 43 minutes.

III.A.5 Purification de l'Hexarelin-B&H

A. Chimie

La purification du produit d'Hexarelin lié au B&H (fig. 29) a été faite par un gradient de 0-40% d'une solution B (100% acétonitrile; 0.05% TFA) dans la sol. A (100% H₂O; 0.05% TFA) sur 40 minutes et de 40 à 60% de

la sol. B sur les 10 minutes suivantes à un débit de 0.5 ml/min sur le HPLC sur une colonne Ultrasphère ODS, 5 μm C-18 à phase renversée. On peut lire en 1, le B&H non réagi; en 2, l'Hexarelin; en 3, 4 et 5, les différents produits de la réaction de chélation (Hexarelin vs B&H). Ces fractions ont été récoltées et évaporées pour ensuite être testées par la méthode radioimmunologique de Roumi (1995) afin d'identifier le site de liaison du chélateur sur l'Hexarelin. Le détecteur u.v. ajusté pour une détection à 280 nm (0.08 aufs) et le détecteur radioactif à une sensibilité égale à 10^4 .

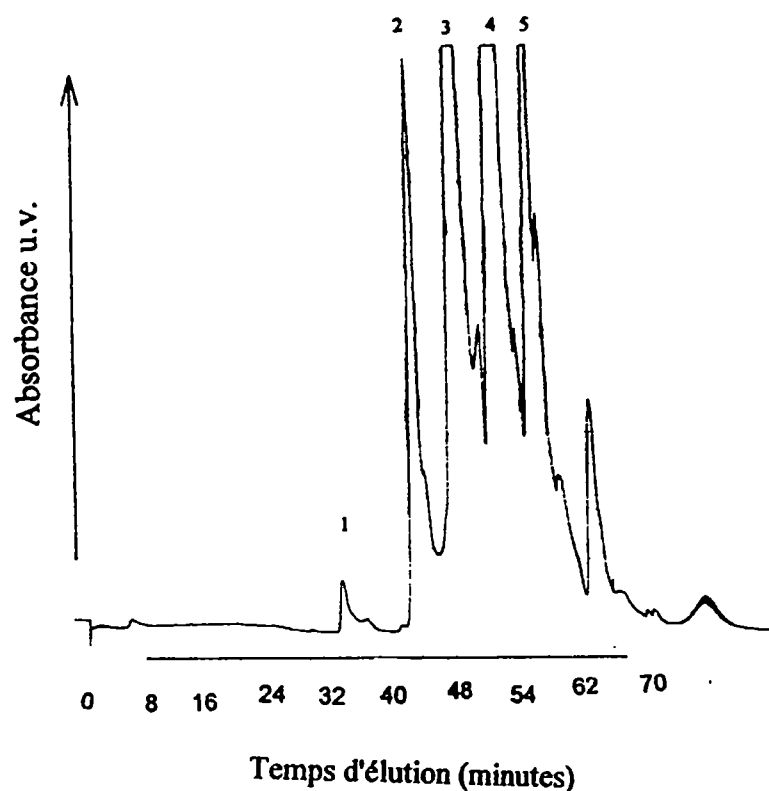


Figure 29. Chromatogramme HPLC de la réaction de l'Hexarelin et du B&H.

III.A.6 Purification du Hexarelin -Dextran

La séparation du complexe Dextran-Hexarelin a été faite sur une colonne chromatographique traditionnelle PD-10 (Sephadex G-25), éluée avec un tampon phosphate. Les fractions ont toutes été analysées sur un spectrophotomètre à 280 nm et les données recueillies pour les fractions contenant le dextran ont été

obtenues grâce aux observations quantitatives colorimétriques sur plaque chromatographique à couche mince (TLC) brûlée à l'acide sulfurique. Celles possédant une absorption UV indiquent la présence du peptide et celles indiquant un changement de couleur (intensité) montrent la présence de dextran. Lorsque les deux phénomènes sont observés, nous avons le produit Hexarelin-Dextran (fig. 19).

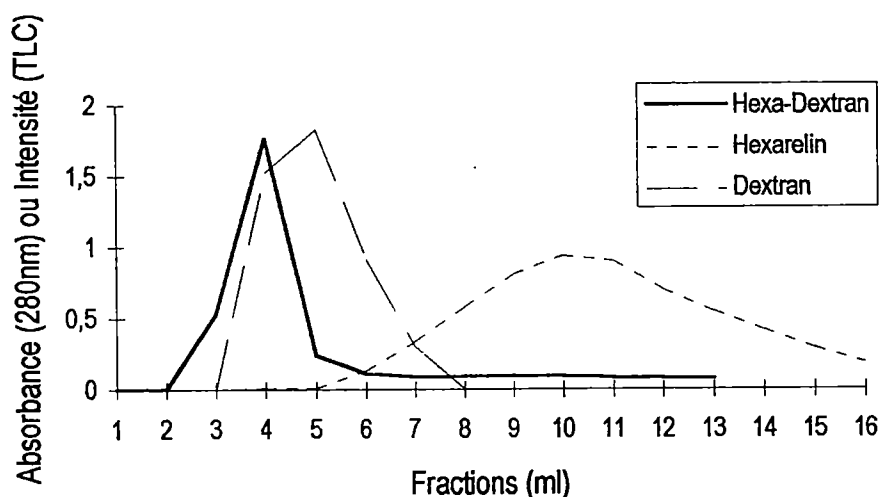


Figure 30. Séparation sur colonne PD-10 des substrats et des produits liés de la réaction de l'Hexarelin et du Dextran.

La figure 30 montre une bonne purification du peptide lié par rapport au peptide libre. La juxtaposition de la courbe Hexa-Dextran et de celle du Dextran libre, ne dérangera en rien la validité des tests de RIA. La particularité des colonnes PD-10 sont leurs nombreuses micropores qui coincent les molécules de petites dimensions laissant les plus grosses éluer plus rapidement de façon prioritaire, phénomène directement relié à leurs tailles (les plus grosses sont les premières à être éluées).

III.A.7 Purification de ^{111}In -Antarelix

Les résultats chromatographiques (fig. 31) ont montré une bonne chélation de l'indium-111 à la molécule peptidique. Le modèle suggéré à la figure 20, un modèle de marquage direct sans chélateur, pourrait être le produit détecté. Cependant, la reproductibilité étant de mise, les résultats n'ont pu être répétés et le modèle doit être rejeté.

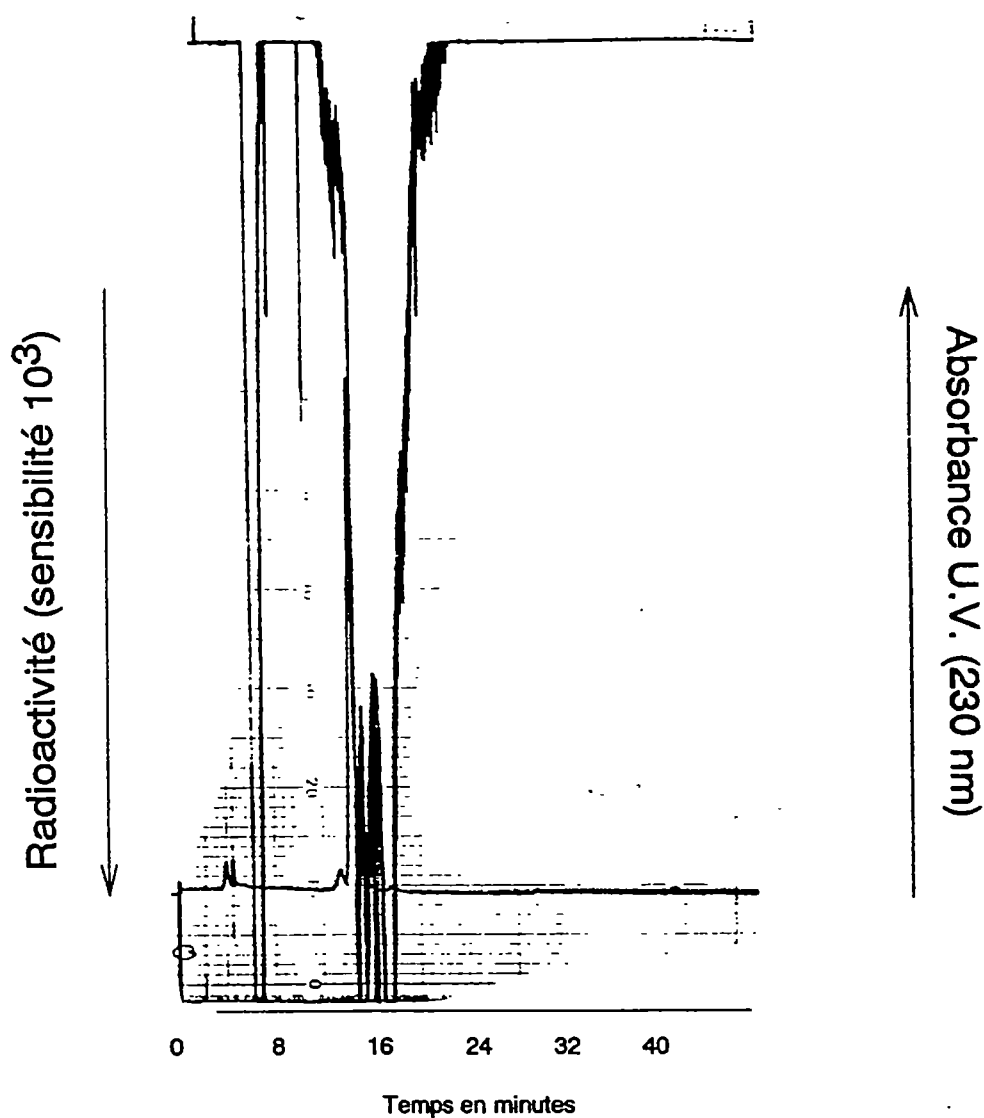


Figure 31. Chromatogramme HPLC sur colonne C-4 delta-pack de l'Antarelix marqué à l'indium-111. Résultats non reproduits.

III.B Études biologiques du ^{125}I -MK-678

i) Biodistribution

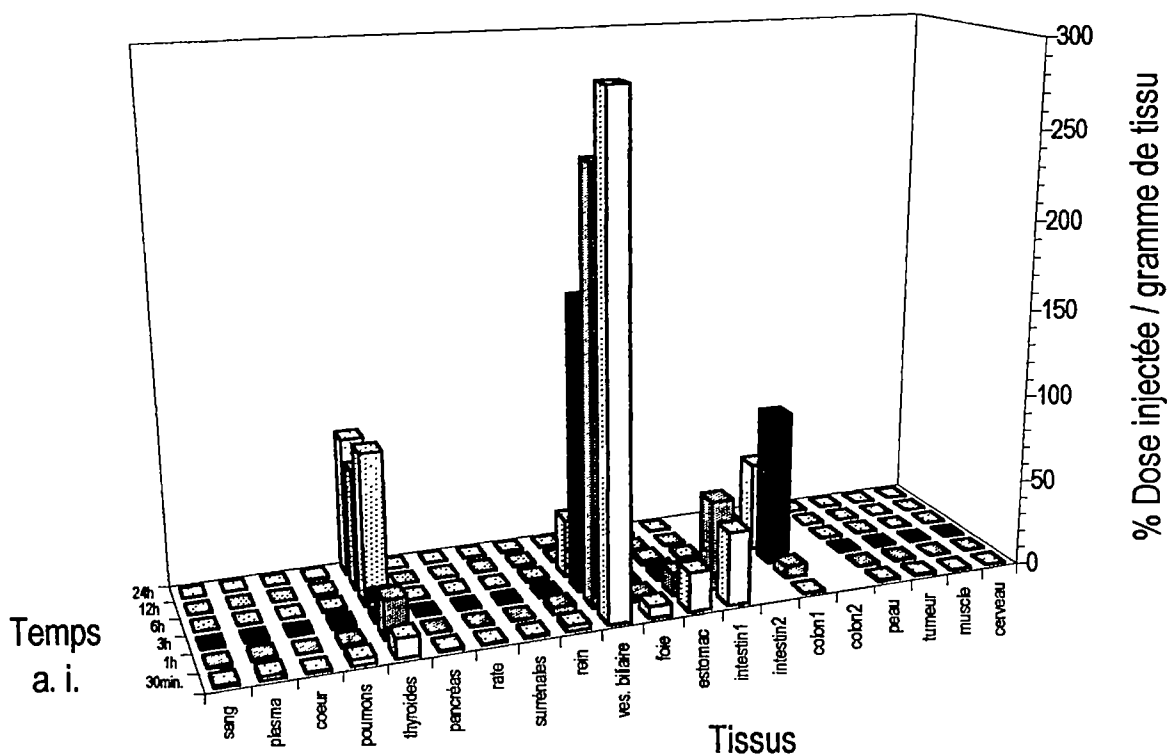


Figure 32. Biodistribution du ^{125}I -MK-678 chez la souris Balb/C mâle à différents temps après injection.

Tableau 1. Résultats numérique de la biodistribution du ^{125}I -MK-678 chez la souris mâle Balb/C.

Tissus	30 minutes			1 heure			3 heures			6 heures			12 heures			24 heures		
	% DI/g	±	esm	% DI/g	±	esm	% DI/g	±	esm	% DI/g	±	esm	% DI/g	±	esm	% DI/g	±	esm
sang	1,39	±	0,17	0,58	±	0,00	0,21	±	0,06	0,12	±	0,08	0,01	±	0,00	0,03	±	0,01
plasma	2,25	±	0,26	0,84	±	0,01	0,22	±	0,12	0,14	±	0,11	0,01	±	0,00	0,04	±	0,02
coeur	0,43	±	0,03	0,21	±	0,01	0,07	±	0,03	0,04	±	0,03	0,00	±	0,00	0,03	±	0,01
poumons	3,61	±	0,67	1,15	±	0,10	1,14	±	0,55	0,50	±	0,31	0,09	±	0,02	0,37	±	0,06
thyroïdes	12,58	±	6,95	21,93	±	11,27	12,63	±	7,20	24,63	±	23,22	nd			79,99	±	20,81
pancréas	1,14	±	0,02	0,73	±	0,12	0,27	±	0,11	0,16	±	0,11	0,02	±	0,00	0,10	±	0,02
rate	0,72	±	0,09	0,51	±	0,05	0,23	±	0,09	0,17	±	0,12	0,03	±	0,00	0,37	±	0,06
surrénales	1,32	±	0,42	0,43	±	0,10	0,44	±	0,34	0,12	±	0,12	0,00	±	0,00	0,28	±	0,12
rein	2,56	±	0,17	2,14	±	0,27	1,10	±	0,41	0,76	±	0,42	0,16	±	0,01	0,52	±	0,08
ves. biliaire	323,48	±	13,46	299,72	±	173,53	96,84	±	55,89	43,99	±	43,20	0,01	±	0,00	0,39	±	0,06
foie	7,23	±	0,15	2,91	±	0,42	1,22	±	0,43	0,98	±	0,50	0,43	±	0,07	1,15	±	0,19
estomac	19,37	±	6,32	18,37	±	14,17	4,68	±	2,66	1,41	±	0,70	0,07	±	0,00	0,20	±	0,08
intestin1	42,46	±	16,10	54,29	±	2,18	5,07	±	0,86	1,56	±	0,33	0,11	±	0,02	0,30	±	0,25
colon1	0,33	±	0,04	13,18	±	12,82	81,68	±	13,30	42,54	±	7,76	0,71	±	0,36	0,64	±	0,50
peau	0,98	±	0,13	0,40	±	0,00	0,16	±	0,05	0,12	±	0,03	0,02	±	0,00	0,05	±	0,02
tumeur	0,88	±	0,35	0,55	±	0,06	0,25	±	0,13	0,13	±	0,10	0,02	±	0,00	0,19	±	0,04
muscle	0,28	±	0,06	0,10	±	0,00	0,04	±	0,02	0,03	±	0,02	0,00	±	0,00	0,02	±	0,01
cerveau	0,04	±	0,00	0,02	±	0,00	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00

L'analogue iodé de la somatostatine, ^{125}I -MK-678, a été injecté *in vivo* chez la souris Balb/C et plusieurs tissus ont été récoltés afin d'obtenir des données de localisation du produit dans le temps. La biodistribution (fig. 32, tab. 1) montre bien: par le niveau de radioactivité de la thyroïde, que la radioiodination du produit est relativement stable *in vivo* ($< 2.0\%$ d.i. tout au long de l'étude, tandis qu'elle est près de 100% pour le Na^{125}I pure (résultats non présentés)); par le niveau de radioactivité de la vésicule biliaire, que le complexe est en grande partie éliminé via les selles entre 6 et 12 heures après l'injection (a.i.); par le niveau de radioactivité de la tumeur, que la captation tumorale semble être négligeable. Ces résultats indiquent que le peptide modifié à l'iode n'est pas idéal pour le dépistage *in situ* des tumeurs EMT-6. Une méthode d'excrétion hépatique est démontrée par le haut pourcentage de la dose injectée par gramme chez la vésicule biliaire (8.0 % d. i. 1 heure a. i.).

ii) Clairance sanguine

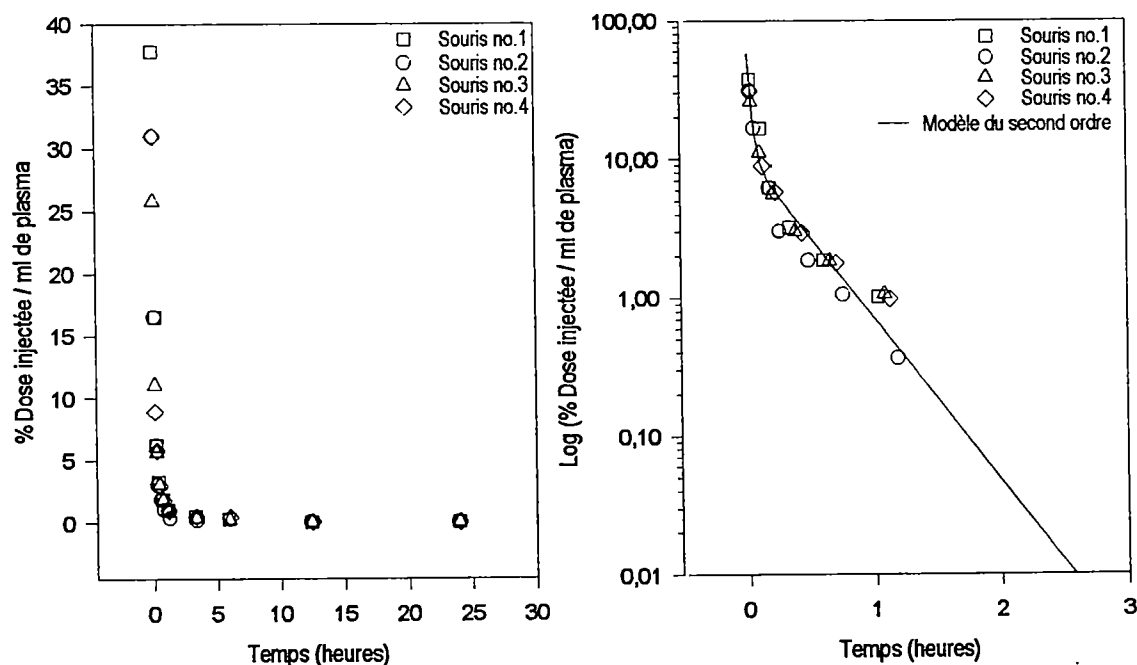


Figure 33. Clairance plasmatique du ^{125}I -MK-678 chez la souris Balb/C mâle (n = 4). Gauche: % dose injectée par millilitre de plasma. Droite: logarithme du % dose injectée par millilitre de plasma.

La clairance (fig. 33) du produit au niveau du système sanguin se traduit par une élimination presque complète 3 heures après l'injection. Le modèle suggéré est à deux exponentielles qui donnent un débit de clairance sanguine égale à environ 17 ml de sang à l'heure (Annexe 1).

iii) Excrétion

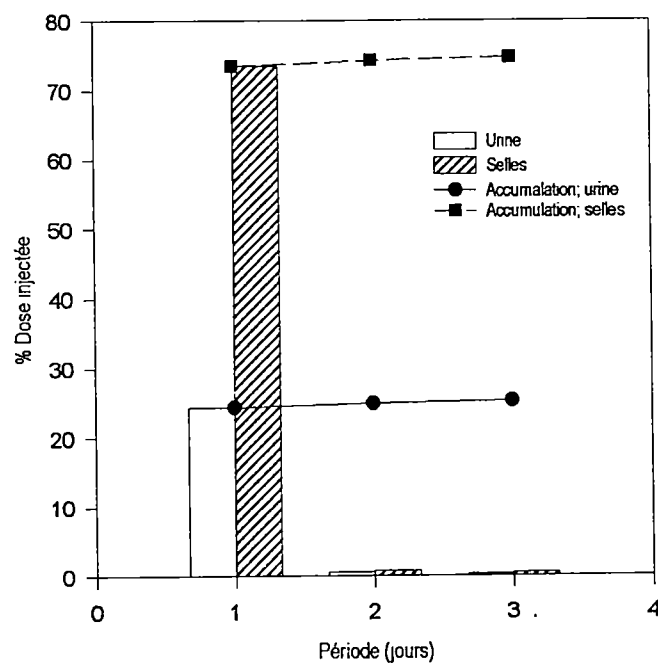


Figure 34. Excrétion du ^{125}I -MK-678 chez la souris mâle Balb/C (n = 4).

L'hypothèse de l'excrétion par voie hépatique retrouvée lors des études de biodistribution est confirmée ici par l'obtention d'évidence d'excrétion fécale (fig. 34), allant près de 75% dès le premier jour, pour le produit modifié de Merck-Frosst.

iv) Autres observations

Lors des prélèvements faits pour l'étude de la clairance sanguine, le niveau de l'hématocrite a été évalué pour étudier certains effets pouvant subvenir après l'incorporation d'un agent inconnu à l'organisme. La figure 35 nous montre le maintient, 24 heures plus tard, d'une diminution de l'hématocrite survenue quelques minutes après l'injection de 200 μ l de ^{125}I -MK-678 par voie intraveineuse.

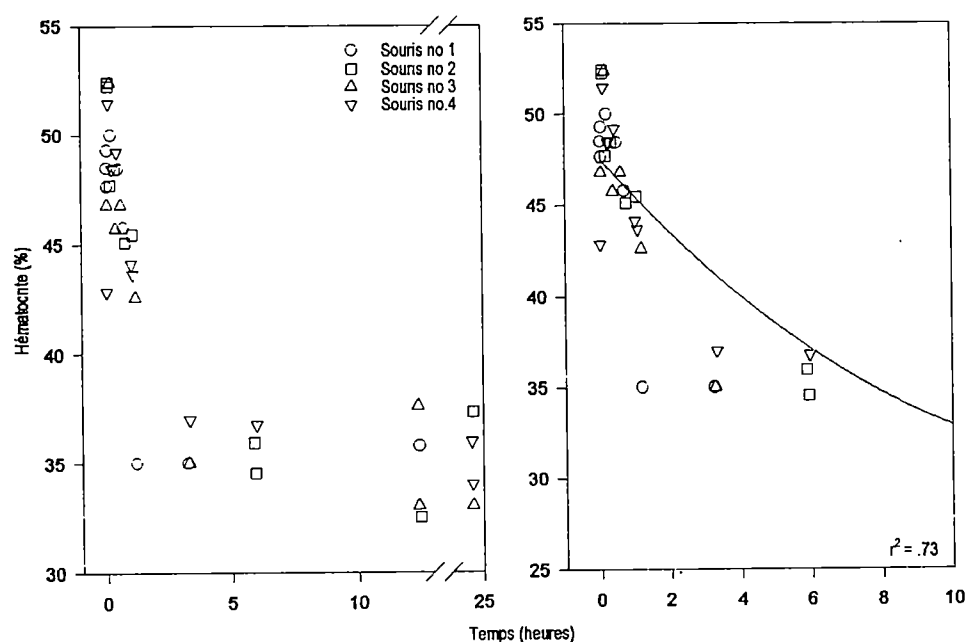


Figure 35. Changement retrouvé dans l'hématocrite à la suite de l'injection du ^{125}I -MK-678.

Cette diminution de l'hématocrite peut être expliquée par la somme de plusieurs critères. Les plus importants sont : 1) la destruction des globules rouges causée par le produit injecté; 2) la quantité du volume de sang retiré du système sanguin (allant jusqu'à $\approx 10\%$ du volume sanguin total de la souris, à la fin de la période d'expérimentation); 3) les saignements externes résultants des ponctions occipitales des capillaires d'échantillonnage; et 4) l'incorporation d'un volume équivalent à environ 25% du volume sanguin total chez la souris Balb/C de 20 grammes.

III.B.2 L'Hexarelin iodé

i) Biodistribution

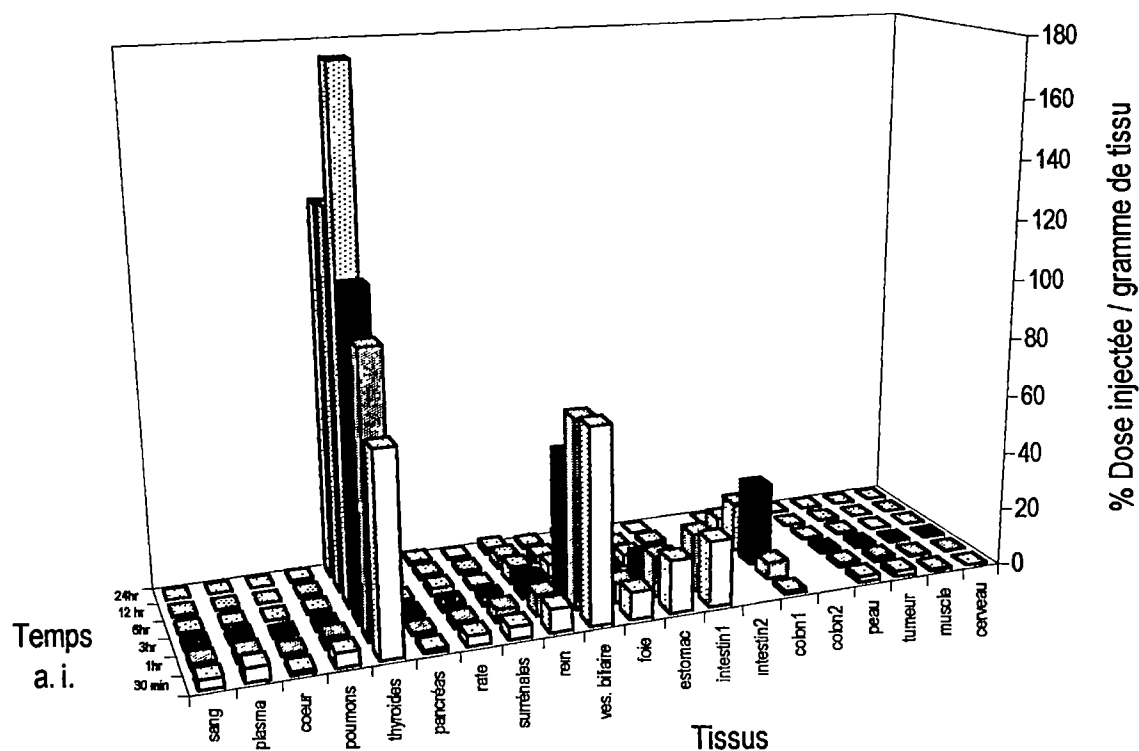


Figure 36. Biodistribution du ^{125}I -Hexarelin chez la souris Balb/C (n=4), portant la tumeur EMT-6, à différents temps après injection.

Tableau 2. Résultats numériques de la biodistribution observée à la figure 36.

Tissus	30 minutes			1 heure			3 heures			6 heures			12 heures			24 heures		
	% DI/g	±	esm	% DI/g	±	esm	% DI/g	±	esm	% DI/g	±	esm	% DI/g	±	esm	% DI/g	±	esm
sang	3,36	±	0,20	2,43	±	0,27	1,35	±	0,25	0,50	±	0,07	0,30	±	0,01	0,06	±	0,00
plasma	4,76	±	0,30	2,95	±	0,21	1,71	±	0,28	0,70	±	0,09	0,40	±	0,02	0,09	±	0,01
coeur	1,19	±	0,10	0,85	±	0,11	0,48	±	0,09	0,24	±	0,03	0,16	±	0,01	0,06	±	0,00
poumons	4,84	±	0,77	3,93	±	0,83	1,33	±	0,18	1,26	±	0,20	0,86	±	0,12	0,59	±	0,22
thyroïdes	68,18	±	13,61	95,35	±	6,36	110,71	±	21,31	177,57	±	32,97	130,39	±	21,57	128,30	±	14,28
pancréas	1,27	±	0,07	0,98	±	0,11	0,56	±	0,10	0,22	±	0,03	0,15	±	0,01	0,03	±	0,01
rate	3,60	±	0,31	2,49	±	0,14	2,36	±	0,26	2,48	±	0,34	1,71	±	0,08	1,11	±	0,18
surrénales	4,30	±	0,98	4,31	±	1,91	2,20	±	0,15	1,07	±	0,07	1,05	±	0,20	0,48	±	0,17
rein	8,11	±	0,60	7,14	±	0,20	6,50	±	0,31	5,79	±	0,59	4,18	±	0,36	2,16	±	0,20
vés. biliaire	66,80	±	16,96	65,09	±	13,04	48,18	±	15,40	4,67	±	0,90	2,96	±	0,56	1,17	±	0,53
foie	9,41	±	0,47	6,83	±	0,21	4,73	±	0,41	5,82	±	0,15	5,09	±	0,22	2,15	±	0,23
estomac	18,13	±	2,54	13,95	±	1,08	8,32	±	1,67	4,06	±	0,98	2,36	±	0,43	0,06	±	0,00
intestin1	22,82	±	0,90	19,99	±	2,74	3,02	±	0,17	0,92	±	0,13	1,43	±	0,19	0,05	±	0,00
colon1	1,18	±	0,05	5,72	±	0,97	28,00	±	1,18	16,98	±	3,51	6,68	±	1,66	0,11	±	0,01
peau	2,15	±	0,19	1,49	±	0,10	0,79	±	0,12	0,34	±	0,06	0,19	±	0,02	0,14	±	0,02
tumeur	1,97	±	0,09	1,64	±	0,12	1,04	±	0,17	0,47	±	0,06	0,30	±	0,02	0,10	±	0,01
muscle	0,56	±	0,04	0,39	±	0,02	0,23	±	0,05	0,09	±	0,02	0,06	±	0,00	0,02	±	0,00
cerveau	0,11	±	0,01	0,08	±	0,00	0,05	±	0,01	0,02	±	0,00	0,01	±	0,00	0,01	±	0,01

Dès l'injection intraveineuse au niveau de la queue chez la souris Balb/C, on peut remarquer l'instabilité des produits marqués récoltés sur le HPLC (fig. 24), grâce à l'absorption de l'iode radioactive à la thyroïde (2.8 % dose injectée 6 heures a.i.) (fig. 36). L'excrétion (fig. 38), comme le démontre l'activité détectée au niveau de la vésicule biliaire, de l'estomac, des intestins et du colon, semble suivre en grande partie la voie hépatique. Néanmoins, l'activité contenue au niveau des reins s'étalant sur les 24 heures de l'étude est un signe d'une excrétion rénale. La quantité de traceur au niveau tumoral est négligeable, ce qui met en doute les capacités de ce produit d'être un bon traceur (tab. 5, p. 66).

ii) Clairance sanguine

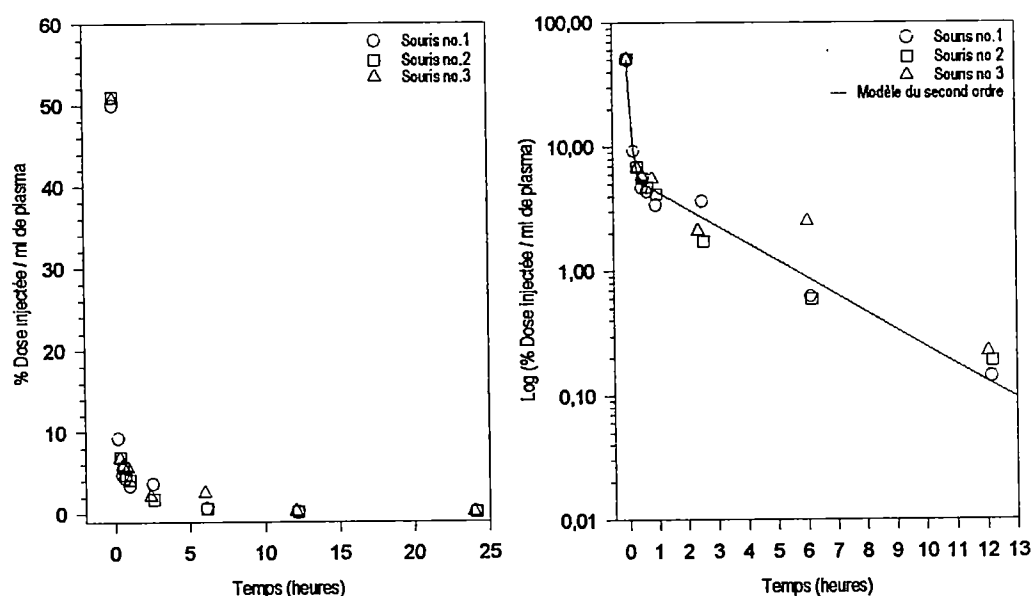


Figure 37. Clairance plasmatique de ^{125}I -Hexarelin chez la souris Balb/C mâle ($n = 3$).

La clairance plasmatique (fig. 37) est pratiquement complétée dès la première heure avec une clairance du volume sanguin d'environ 5 ml/min. et suit un modèle à deux exponentielles (voir les données de calcul comparatif en Annexe).

iii) Excrétion

L'hypothèse de l'excrétion hépatique comme système principal d'évacuation, n'est pas exacte. Les résultats montrent bien que le produit est principalement éliminé par l'urine (fig. 38). Cependant, la filtration hépatique est aussi d'une grande importance étant donné que l'on retrouve près de 35 % de la dose injectée dans les selles.

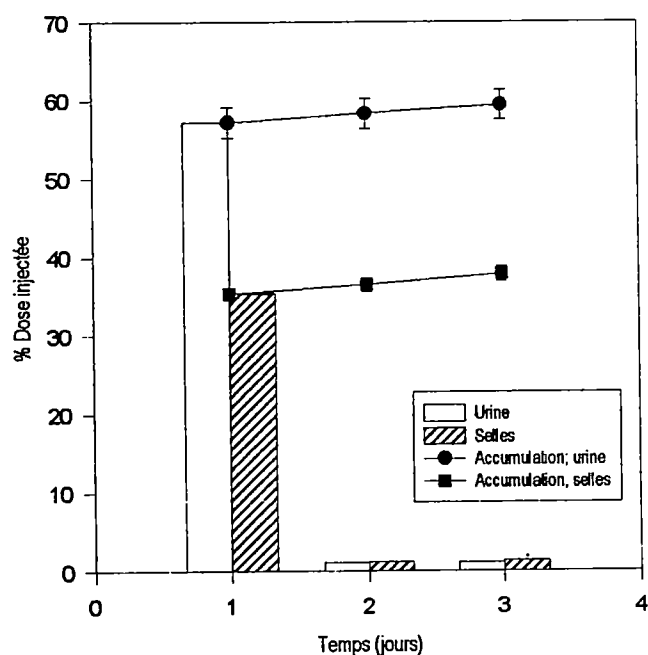


Figure 38. Excrétion du ^{125}I -Hexarelin chez la souris mâle Balb/C (n = 3).

iv) Autres observations

Lors des prélèvements faits pour l'étude de la clairance sanguine, le niveau de l'hématocrite a été évalué pour étudier certains effets circulatoires pouvant subvenir après l'incorporation d'un agent inconnu à l'organisme. Une diminution graduelle a été observée allant jusqu'à près de 20 %, 6 heures après

l'incorporation de 200 μ l du produit par voie intraveineuse sans augmentation 24 heures a.i. (fig. 39). Les explications à la section III.B.iv s'appliquent aussi bien ici.

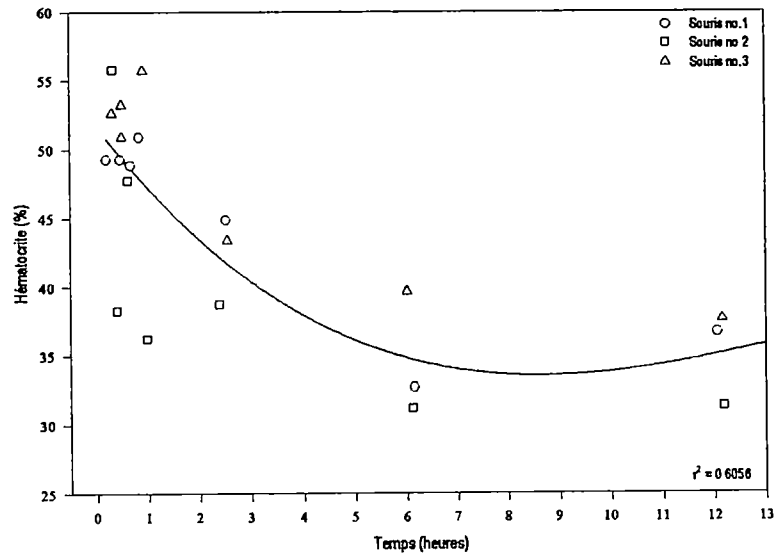


Figure 39. Variation du niveau de l'hématocrite chez la souris Balb/C mâle après incorporation de ^{125}I -Hexarelin.

III.B.3. L'Antarelix iodé

i) Biodistribution

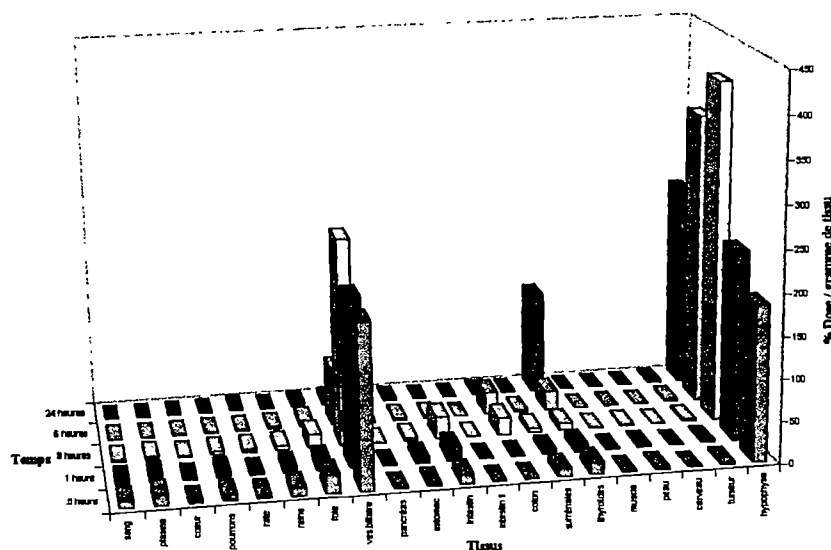


Figure 40. Biodistribution du ^{125}I -Antarelix chez la souris Balb/C mâle ($n = 4$) portant la souche tumorale EMT-6 à différents temps après injection.

Tableau 3. Valeurs numérique de la biodistribution en % dose injectée / gramme de tissu, et l'écart type sur la moyenne (esm).

Tissus	30 minutes			1 heure			3 heures			6 heures			24 heures		
	% D/l/g	±	esm	% D/l/g	±	esm	% D/l/g	±	esm	% D/l/g	±	esm	% D/l/g	±	esm
sang	7,49	±	0,43	4,08	±	0,39	1,94	±	0,09	0,32	±	0,05	0,12	±	0,01
plasma	12,05	±	0,54	7,09	±	0,64	3,35	±	0,20	0,49	±	0,05	0,16	±	0,01
cœur	2,57	±	0,13	1,87	±	0,16	1,40	±	0,07	0,60	±	0,04	0,48	±	0,05
poumons	6,51	±	0,20	5,93	±	0,75	3,77	±	0,11	1,58	±	0,20	0,99	±	0,11
rate	4,07	±	0,10	2,54	±	0,16	3,80	±	0,46	1,95	±	0,18	2,22	±	0,17
reins	9,24	±	0,26	6,72	±	0,48	5,05	±	0,27	2,21	±	0,16	0,89	±	0,06
foie	21,36	±	0,26	13,81	±	0,61	16,11	±	1,03	7,57	±	0,50	4,25	±	0,37
ves.biliaire	193,86	±	63,64	100,55	±	40,45	246,05	±	43,91	68,76	±	37,47	8,81	±	2,77
pancréas	1,07	±	0,06	0,73	±	0,05	0,56	±	0,03	0,25	±	0,02	0,17	±	0,01
estomac	3,31	±	0,40	6,65	±	0,53	3,53	±	0,41	2,02	±	0,39	1,63	±	0,42
intestin	10,35	±	0,76	15,87	±	2,17	26,03	±	4,70	3,04	±	0,17	0,44	±	0,02
colon	0,77	±	0,03	0,88	±	0,06	19,75	±	2,08	26,11	±	1,31	1,84	±	0,16
surrénales	8,42	±	0,19	4,74	±	1,04	4,72	±	0,51	1,81	±	0,16	1,48	±	0,07
thyroïdes	12,77	±	2,01	8,65	±	0,63	8,01	±	3,07	22,38	±	6,08	122,98	±	29,71
muscle	0,69	±	0,01	0,45	±	0,05	0,40	±	0,02	0,16	±	0,01	0,09	±	0,01
peau	2,46	±	0,32	1,50	±	0,14	1,35	±	0,09	0,49	±	0,03	0,28	±	0,02
cerveau	0,23	±	0,01	0,15	±	0,02	0,09	±	0,00	0,03	±	0,00	0,01	±	0,00
tumeur	2,76	±	0,39	2,13	±	0,11	2,77	±	0,27	2,49	±	0,89	2,41	±	0,82
hypophyse	185,02	±	22,83	226,03	±	34,79	407,08	±	47,04	351,92	±	40,68	245,05	±	26,03

Les éléments importants retenus de cette étude sont la grande stabilité du produit *in vivo* (niveau bas de radioactivité à la thyroïde; 0,43 % dose injectée après 24 heures), l'excrétion au niveau hépatique (représentée par l'activité retrouvée dans la vésicule biliaire et dans la voie gastro-intestinale) et surtout l'activité biologique intacte de la molécule après radioiodination confirmée par le grand pourcentage de dose injectée par gramme au niveau de l'hypophyse (0,24 % d.i. après 24 heures). De plus on peut remarquer de faibles mais intéressants ratios tumoraux (tumeur vs peau, muscle, sang) 24 heures a.i. (tab. 5, p. 66).

ii) Clairance sanguine

L'élimination de la voie sanguine de l'Antarelix iodé est relativement rapide avec une clairance du compartiment sanguin égale à ~3 ml/min. La figure 41 nous montre bien la disparition rapide du traceur de la voie sanguine ainsi qu'une clairance suivant un modèle à deux exponentielles (voir les données de calcul comparatif à l'Annexe 1).

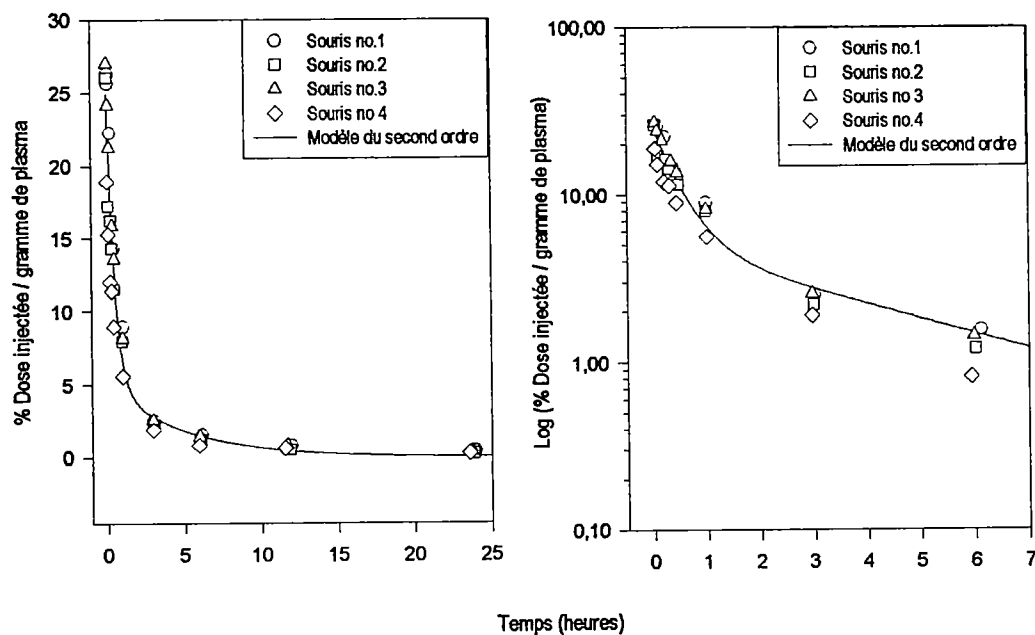


Figure 41. Clairance plasmatique du ^{125}I -Antarelix chez la souris Balb/C (n = 4). Gauche: modèle linéaire. Droite; modèle logarithmique.

iii) Excrétion

L'élimination complète de l'organisme, telle qu'observée lors de la biodistribution, est environ 75% hépatique. La grande partie de la radioactivité se retrouve, par le mécanisme d'élimination hépatobiliaire, dans la voie gastro-intestinale dans les premières heures suivant l'injection (fig. 42, tableau 3).

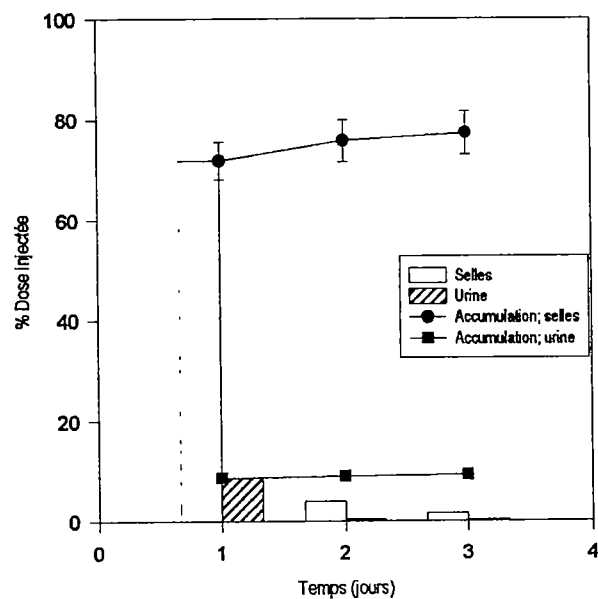


Figure 42. Excrétion totale du ^{125}I -Antarelix chez la souris Balb/C mâle (n = 4) après injection.

iv) Autres observations

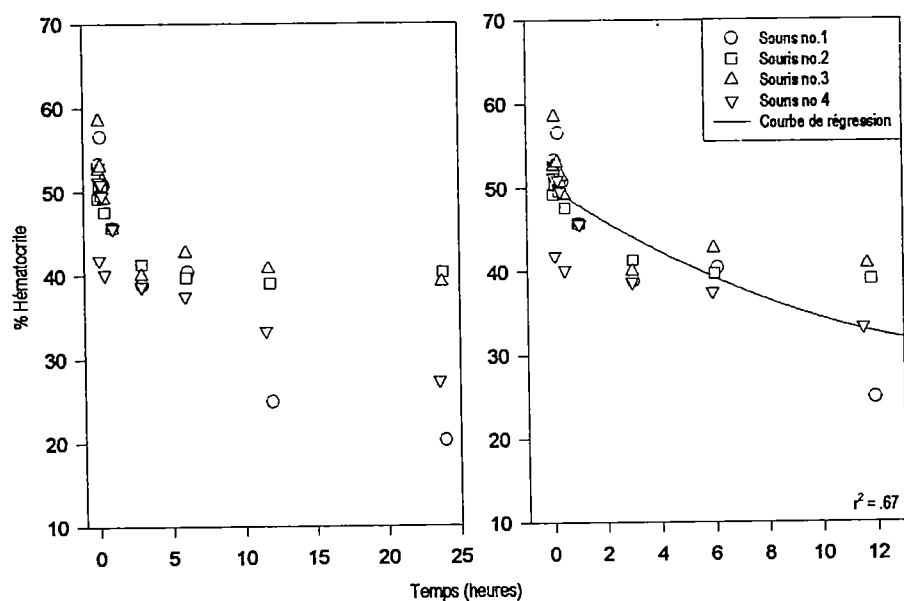


Figure 43. Diminution de l'hématocrite après injection de 200 μl de ^{125}I -Antarelix chez la souris Balb/C mâle (n = 4).

On peut remarquer une diminution de l'hématocrite d'un peu plus de 10% après l'incorporation de 200 μ l du dérivé iodé de l'Antarelix. Ce qui correspond davantage au volume sanguin retiré tout au long de la période expérimentale, qu'aux autres raisons mentionnées à la section III.A.iv.

III.B.4. L'[111 In-DTPA]-Hexarelin

i) Biodistribution

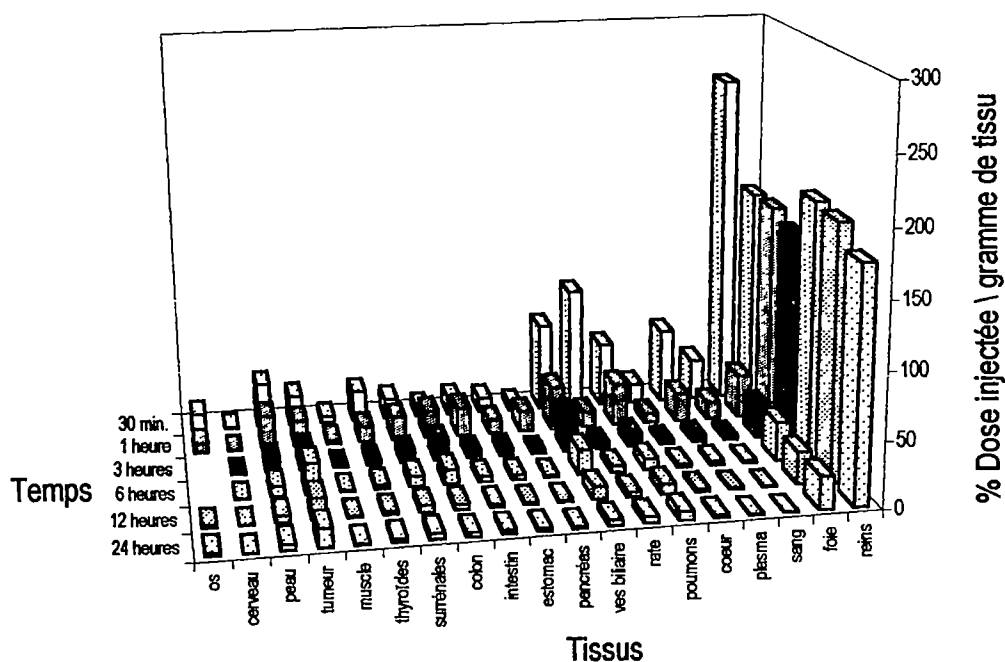


Figure 44. Biodistribution du [111 In-DTPA]-Hexarelin chez la souris Balb/C mâle (n = 4) portant la tumeur EMT-6 à différents temps a.i..

Tableau 4. Valeurs numériques de la biodistribution du [^{111}In -DTPA]-Hexarelin chez les souris mâles Balb/C (n = 4).

Tissus	30 minutes			1 heure			3 heures			6 heures			12 heures			24 heures		
	% D/g	±	esm	% D/g	±	esm	% D/g	±	esm	% D/g	±	esm	% D/g	±	esm	% D/g	±	esm
sang	3,12 ±	0,05		1,28 ±	0,16		0,28 ±	0,04		0,15 ±	0,01		0,06 ±	0,01		0,03 ±	0,01	
plasma	5,66 ±	0,26		2,12 ±	0,26		0,49 ±	0,06		0,27 ±	0,04		0,13 ±	0,02		0,05 ±	0,01	
cœur	1,43 ±	0,07		0,70 ±	0,08		0,26 ±	0,03		0,25 ±	0,04		0,22 ±	0,02		0,20 ±	0,03	
poumons	4,84 ±	0,79		3,23 ±	0,51		1,00 ±	0,05		0,84 ±	0,13		0,76 ±	0,40		0,66 ±	0,09	
rate	9,36 ±	0,83		1,17 ±	0,19		0,42 ±	0,06		0,48 ±	0,08		0,36 ±	0,04		0,47 ±	0,07	
reins	16,42 ±	0,96		16,49 ±	1,24		15,78 ±	1,80		19,38 ±	2,61		19,08 ±	0,82		17,49 ±	3,01	
foie	25,50 ±	0,74		3,29 ±	0,09		2,59 ±	0,27		2,89 ±	0,37		2,44 ±	0,20		2,48 ±	0,39	
ves.biliaire	6,72 ±	1,06		3,29 ±	0,27		2,91 ±	0,22		1,90 ±	0,85		0,94 ±	0,19		0,41 ±	0,05	
pancréas	0,54 ±	0,02		1,52 ±	1,22		0,13 ±	0,02		0,13 ±	0,02		0,11 ±	0,01		0,12 ±	0,02	
estomac	1,12 ±	0,09		1,03 ±	0,22		0,47 ±	0,07		0,34 ±	0,05		0,16 ±	0,02		0,21 ±	0,04	
intestin	1,32 ±	0,01		2,16 ±	0,68		0,47 ±	0,05		0,38 ±	0,06		0,22 ±	0,01		0,26 ±	0,05	
colon	0,74 ±	0,08		2,07 ±	0,98		1,50 ±	0,10		1,08 ±	0,16		0,39 ±	0,05		0,29 ±	0,03	
surrénales	1,56 ±	0,26		1,74 ±	0,54		0,84 ±	0,11		0,78 ±	0,19		0,49 ±	0,02		0,42 ±	0,09	
thyroïdes	2,30 ±	0,10		1,19 ±	0,17		0,29 ±	0,04		0,32 ±	0,05		0,26 ±	0,01		0,24 ±	0,05	
muscle	0,47 ±	0,02		0,29 ±	0,05		0,10 ±	0,01		0,10 ±	0,02		0,09 ±	0,00		0,09 ±	0,01	
tumeur	2,23 ±	0,27		1,96 ±	0,12		1,58 ±	0,39		2,30 ±	0,74		1,60 ±	0,16		1,39 ±	0,24	
peau	3,35 ±	0,17		2,46 ±	0,24		0,95 ±	0,12		0,75 ±	0,12		0,49 ±	0,03		0,44 ±	0,06	
cerveau	0,06 ±	0,01		0,03 ±	0,01		0,02 ±	0,00		0,01 ±	0,00		0,01 ±	0,00		0,01 ±	0,00	
os	1,25 ±	0,16		0,68 ±	0,13		nd			nd			0,17 ±	0,01		0,22 ±	0,01	

Les résultats de biodistribution semblent démontrer une fixation rénale du produit (fig. 44). L' [^{111}In]-DTPA est reconnu pour être un très bon agent pour la scintigraphie rénale, surtout au niveau de la filtration glomérulaire du rein et est, par ce phénomène, filtré en majeure partie dans les premières heures suivant l'injection. Donc une toute autre explication que la séparation du lien amide doit être considérée pour comprendre la fixation rénale du produit. Par contre, la captation tumorale est faible, mais possède un léger gain sur le sang, la peau et les muscles (tab. 5; p. 66).

ii) Clairance sanguine

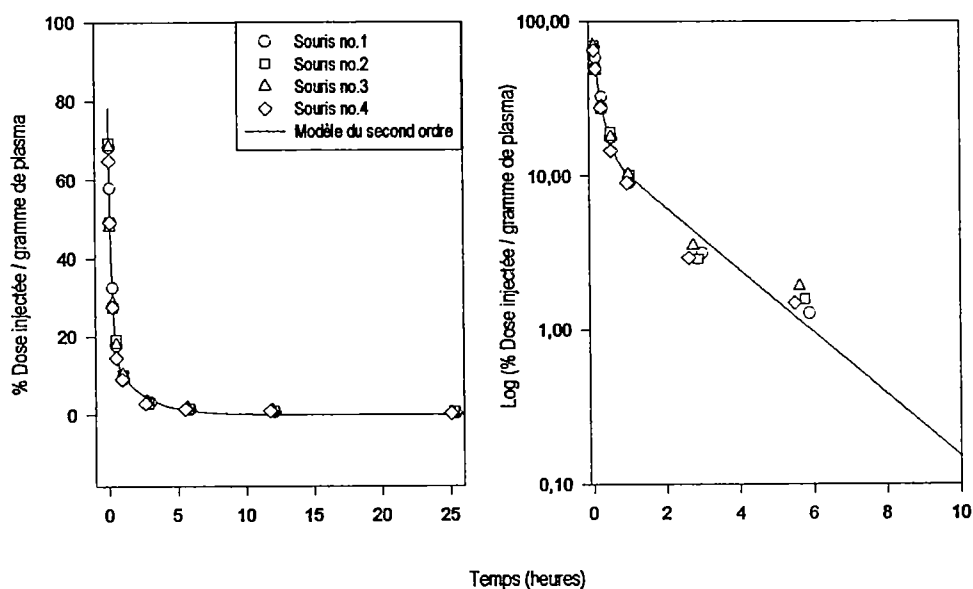


Figure 45. Clairance plasmatique du complexe [^{111}In -DTPA]-Hexarelin chez la souris Balb/C mâle (n = 4). Gauche: graphique linéaire de la clairance. Droite: graphique logarithmique de la clairance.

On voit bien à la figure 45 que le produit est éliminé du système sanguin, en majeure partie, dans les 3 premières heures suivant l'injection. Ces résultats sont, malgré la grande quantité de traceur restant lié aux reins même 24 heures a.i., des plus rassurant et éliminent toutes possibilités de reflux sanguin à partir de ces derniers.

iii) Excrétion

Malgré la fixation rénale, l'excrétion du produit est prouvée comme étant ~70% rénale et survient dans les premières heures a.i. (fig. 46).

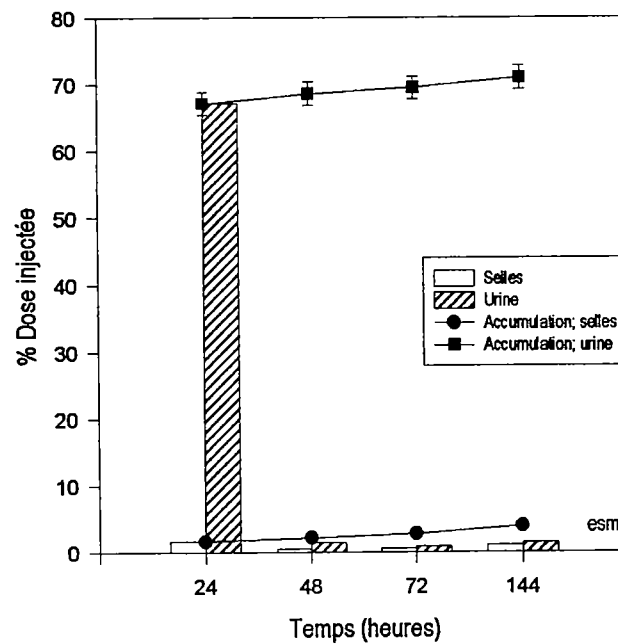


Figure 46. Excrétion du complexe [^{111}In -DTPA]-Hexarelin chez la souris Balb/C mâle (n = 2).

iv) Autres observations

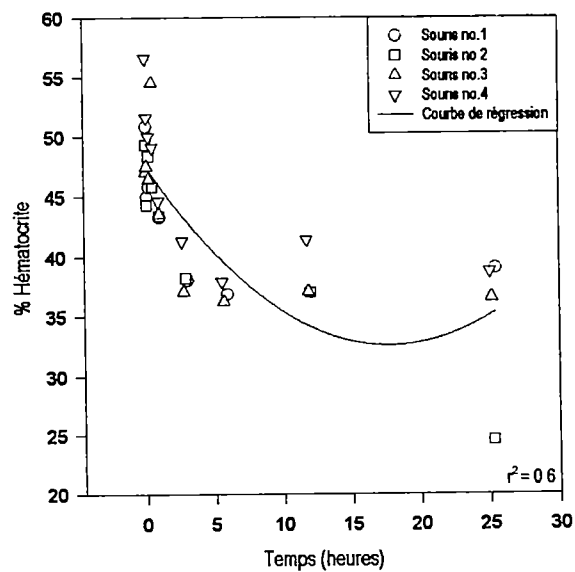


Figure 47. Évaluation de l'hématocrite chez la souris Balb/C mâle après injection de 200 μl du dérivé d'Hexarelin lié au DTPA; fraction 1.

La figure 47 montre l'effet du dérivé d'Hexarelin lié au DTPA sur le niveau de l'hématocrite. On peut remarquer une nette diminution de près de 15% six heures après l'injection de 200 μ l du produit, et aucune augmentation n'est observée sur les 24 heures de l'étude (voir section III.B.iv).

L'Hexareline possède deux sites aminés ($-NH_2$) pouvant réagir au DTPA anhydreux; un en position alpha (α), l'histidine, et l'autre en position epsilon (ϵ), la lysine. Afin de pouvoir caractériser les pics par leur type de liaison au DTPA, des essais radioimmunologiques (RIA) ont été effectués à l'aide d'anticorps spécifiques à l'une ou l'autre terminaison du peptide. La liaison de l'anticorps à sa terminaison, indique que l'amine, correspondant à cette terminaison, n'a pas réagi au DTPA. Les trois pics ont été soumis, indépendamment, à des tests pour déterminer si les liens du peptides au DTPA se sont faits à l'amine en position α , ou à celle en position ϵ . Les résultats à la figure 48 sont ceux de la compétition en présence de l'anticorps 244, spécifique à la terminaison amine (α) du peptide. Les résultats de l'anticorps 281, spécifique à la terminaison carboxylique du peptide (correspondant ici à la position ϵ), sont comparables. Le mouvement des courbes vers la droite indique que la spécificité des produits pour l'anticorps est quasi nulle; les pics 1, 2 et 3, représentant divers types de liaison du DTPA à l'Hexareline, ont conservé respectivement 0.34%, 0.24% et 0.21% de l'activité biologique initiale de l'Hexareline. Le fait que tous les pics suivent des courbes similaires montre que chaque produit est modifié aux deux sites (alpha et epsilon) et/ou a complètement perdu son affinité biologique, et n'est pas reconnu par l'anticorps. Ceci implique que l'identification d'une fraction de HPLC possédant des liens à seulement un site au lieu de deux, est impossible.

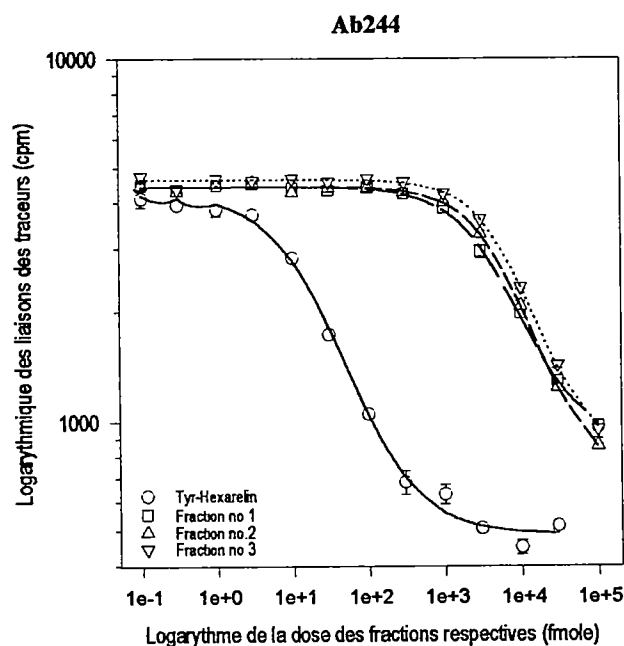


Figure 48. Essais radioimmunologiques (RIA) des fractions récoltées sur HPLC de la réaction de l'Hexarelin et du substrats DTPA. Résultats obtenus de la compétition à l'anticorps 244 (N-terminal) comparés au standard Tyr-Hexarelin iodé.

Tableau 5. Comparaison des différents ratios pertinents pour l'imagerie médicale en catégories de temps après injection par voie caudale (a.i.).

Temps après injection (a.i.) (heures)	Produits (radiomarqué)	nombre d'animaux (n)	C tumeur (% dose/g)		Ratio		
			moyenne	(écarts)	tumeur/sang (moyenne)	tumeur/peau (moyenne)	tumeur/muscle (moyenne)
0,5	MK-678	3	0.88	(0.24-1.45)	0,63	0,90	3,10
0,5	Hexarelin	4	1.97	(1.77-2.22)	0,59	0,92	3,55
0,5	Hexarelin-DTPA	4	2.23	(1.85-3.02)	0,72	0,67	4,78
0,5	Antarelix	4	2.76	(1.83-3.63)	0,37	1,12	4,01
1	MK-678	2	0.55	(0.49-0.62)	0,96	1,37	5,40
1	Hexarelin	4	1.64	(1.37-1.91)	0,68	1,10	4,23
1	Hexarelin-DTPA	4	1.96	(1.79-2.30)	1,53	0,80	6,83
1	Antarelix	4	2.13	(1.82-2.34)	0,52	1,42	4,76
3	MK-678	4	0.25	(0.02-0.52)	1,16	1,49	6,34
3	Hexarelin	4	1.04	(0.63-1.45)	0,77	1,31	4,45
3	Hexarelin-DTPA	4	1.58	(0.58-2.33)	5,57	1,67	16,55
3	Antarelix	4	2.77	(1.97-3.17)	1,42	2,04	6,86
6	MK-678	4	0.13	(0.02-0.44)	1,06	1,06	4,22
6	Hexarelin	4	0.47	(0.34-0.61)	0,94	1,38	5,53
6	Hexarelin-DTPA	4	2.30	(1.05-4.01)	15,53	3,07	22,55
6	Antarelix	4	2.49	(1.17-5.09)	7,77	5,06	15,57
12	MK-678	4	0.017	(0.008-0.027)	1,75	0,91	7,29
12	Hexarelin	4	0.30	(0.27-0.34)	0,99	1,59	4,71
12	Hexarelin-DTPA	4	1.60	(1.31-2.05)	24,93	3,29	16,95
12	Antarelix		nd		nd	nd	nd
24	MK-678	4	0.19	(0.012-0.028)	7,25	3,67	12,35
24	Hexarelin	4	0.10	(0.06-0.13)	1,80	0,72	4,75
24	Hexarelin-DTPA	4	1.39	(0.98-2.08)	47,28	3,13	15,99
24	Antarelix	4	2.41	(1.08-4.49)	20,38	8,53	25,77

III.B.5 L'Hexarelin-B&H

i) Test Radioimmunologique (RIA)

Comme dans le cas de l'Hexarelin-DTPA, le peptide peut lier le groupement hydroxyphenylpropionate à son amine terminal (position α) et à celui de la lysine (position ϵ). Pour bien caractériser les types de liaisons à la purification obtenue sur HPLC, des épreuves radioimmunologiques ont été faites, par la méthode de Roumi et Ong (1995), sur les diverses fractions purifiées.

La figure 49 résume clairement que les fractions 2 et 3 récoltées (fig. 29) et testées par RIA ont presque totalement perdu leur activité biologique, tandis que les fractions 4 et 5 ont, par contre, gardé une bonne affinité envers les anticorps 244 (liaison α) et 281 (liaison ϵ).

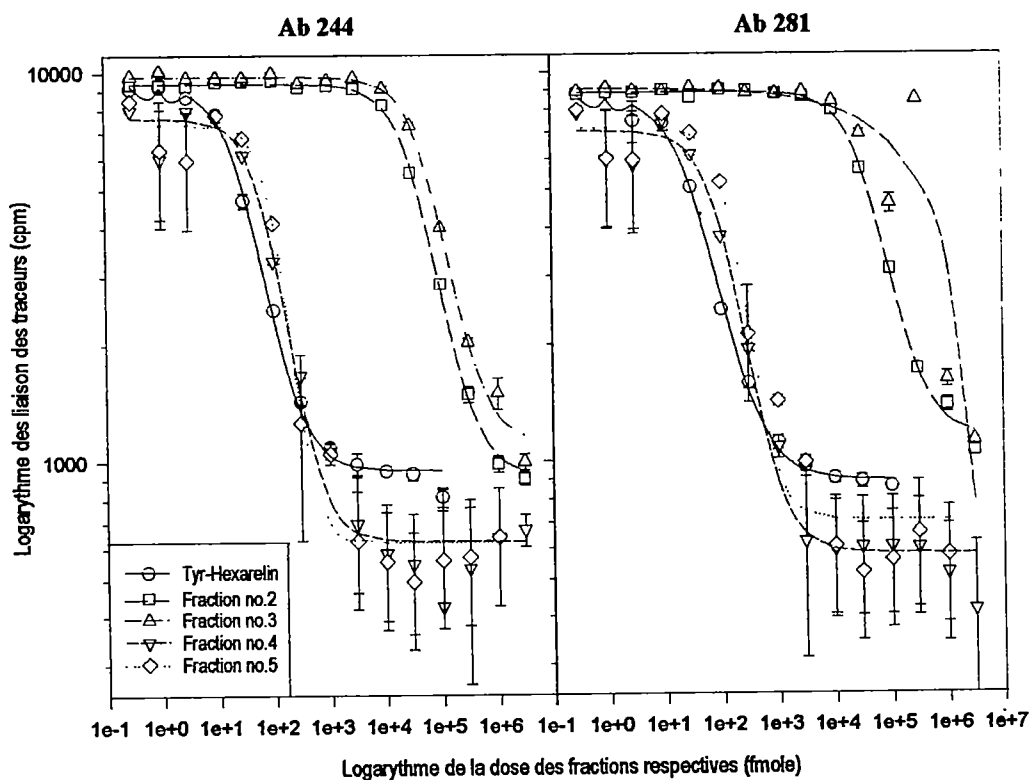


Figure 49. Essais radioimmunologiques (RIA) des fractions récoltées sur HPLC de la réaction de l'Hexarelin et du substrat B&H. Gauche: Résultats obtenus de la compétition à l'anticorps 244 (N-terminal) comparés au standard Tyr-Hexarelin iodé. Droite: Ceux en compétition à l'anticorps 281 (C-terminal).

Quatre fractions purifiées par HPLC ont été testées pour leur activité immunologique à l'anticorps 244 (N-terminal) et 281 (C-terminal) tel qu'expliqué à la page 65. La figure 49 montre bien l'activité obtenue pour chacune des fractions pour chaque anticorps. Les fractions 2 et 3 sont pratiquement dépourvues d'activité aux deux anticorps; elles ont des rétentions d'activité biologique de 0.08% et 0.04% respectivement pour le 281, et de 0.73% et 0.046% pour le 244. Ceci indique que ces deux fractions récoltées du HPLC (fig. 29) représentent des formes dénaturées de l'Hexareline au lieu de différentes formes liées au DTPA. Par ailleurs, les fractions 4 et 5 ont conservé une certaine affinité aux deux anticorps; pour le 244, une activité de 30.8% et de 21% respectivement; et pour le 281, une activité de 36% et de 26.7%. Ceci indique qu'il y a eu conservation de l'activité biologique du peptide et qu'il y a peut-être liaison au DTPA. Ces deux tests ont comme référence un analogue de l'Hexareline, la Tyr-Hexarelin (EP 92110) marqué à l'iode 125. Les tests ont tous été faits en triplicata.

III.B.6 Hexarelin-Dextran

Afin de vérifier si le chélateur peut nuire à l'activité biologique de la molécule peptidique, un test de radioimmunologie (RIA) a été effectué sur le produit synthétisé. Effectivement, comme le montre bien la figure 50, la molécule conserve à, 6.3% pour l'Ab 244 et à 8% pour l'Ab 281, son intégrité biologique aux terminaisons amines respectives.

Ces résultats ne démontrent en aucun cas à quel site de liaison le Dextran s'est lié au peptide. L'une des raisons peut être la dimension du dextran (~10000) par rapport à celle du peptide (~1000). Pour cette raison, il nous est impossible de déterminer si ce complexe possède un quelconque intérêt pour la médecine nucléaire, et nous avons convenu de ne pas effectuer les études de marquages et de biodistribution.

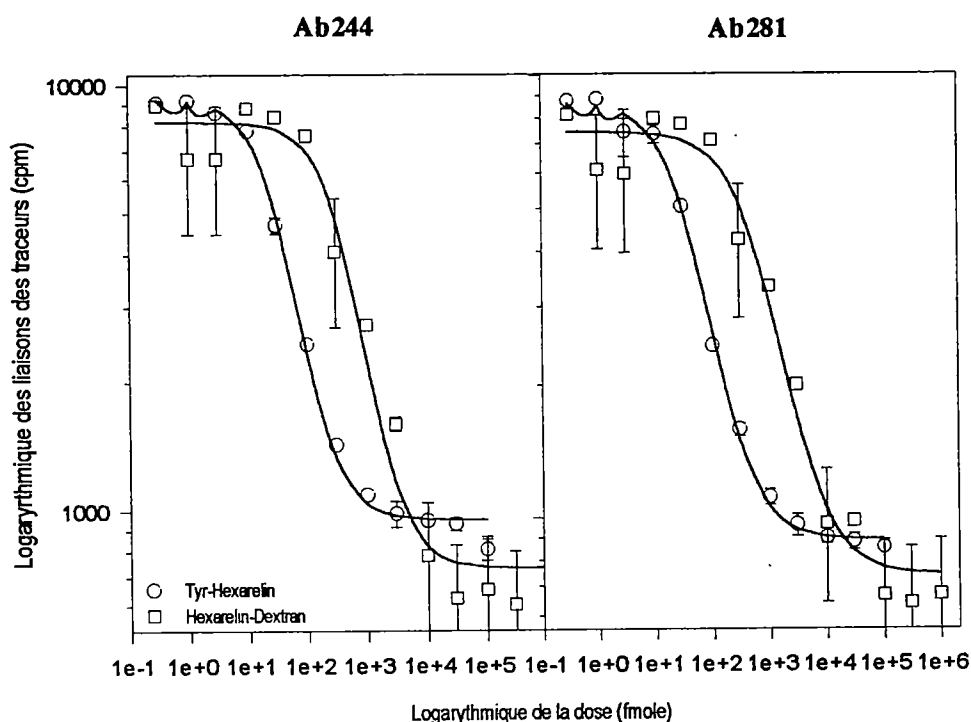


Figure 50. Essais radioimmunologiques (RIA) des fractions récoltées sur HPLC de la réaction de l'Hexarelin et du substrat Dextran. Droite: Résultats obtenus de la compétition à l'anticorps 244 (N-terminal) comparés au standard Tyr-Hexarelin iodé. Gauche: Ceux en compétition à l'anticorps 281 (C-terminal).

III.B.7 Étude de liaison spécifique de l'Antarelix iodé *in vitro*

Afin de vérifier si les cellules tumorales possèdent, ou non, des récepteurs spécifiques au peptides investigués, ces derniers ont été étudiés sous différentes conditions en présence de deux souches tumorales mammaires; EMT-6 et MCF-7. Les figures 51 à 56 présentent les résultats des études de liaison *in vitro* effectuées sur les cellules tumorales EMT-6 sous différentes conditions. On peut remarquer dans la majorité des cas, que les liaisons non spécifiques (NS) sont plus élevées ou égales à celles spécifiques (Bt). Toutes les observations effectuées lors de ces tests *in vitro* démontrent que la liaison spécifique de l'analogue iodé de l'Antarelix, aux cellules tumorales investiguées, est impossible. Notez que toutes les erreurs des figures suivantes sont représentées en écart-type sur la moyenne (esm) (voir l'Annexe 3 pour le calcul détaillé).

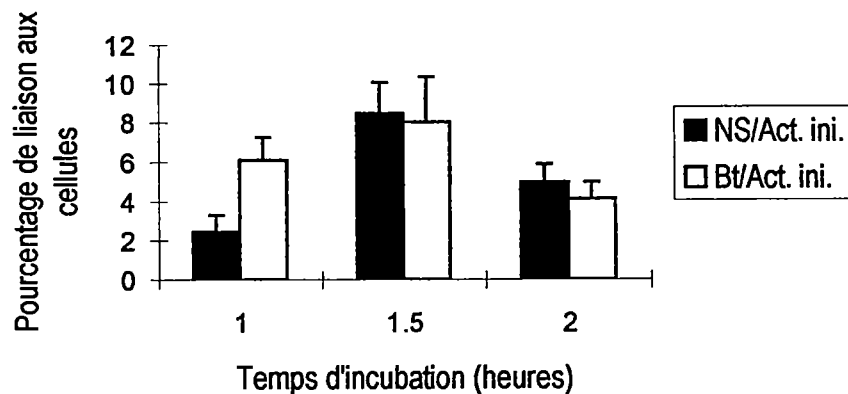


Figure 51. Liaisons *in vitro* de l'Antarelix iodé aux cellules tumorales EMT-6 en pourcentage de l'activité initialement incorporée. Étude effectuée sur des cellules en suspension à 4 degrés Celsius (n = 3).

La figure 51 montre une légère liaison spécifique après 1 heure d'incubation sur les cellules EMT-6 en suspension à 4 °C. Cependant, après vérification des données représentées par cette figure, on a pu remarquer une trop grande variation des résultats pour conclure qu'il y a eu liaisons spécifiques aux cellules tumorales. Étant une méthode peu utilisée, les études en suspension ont été remplacées par des études en pétris.

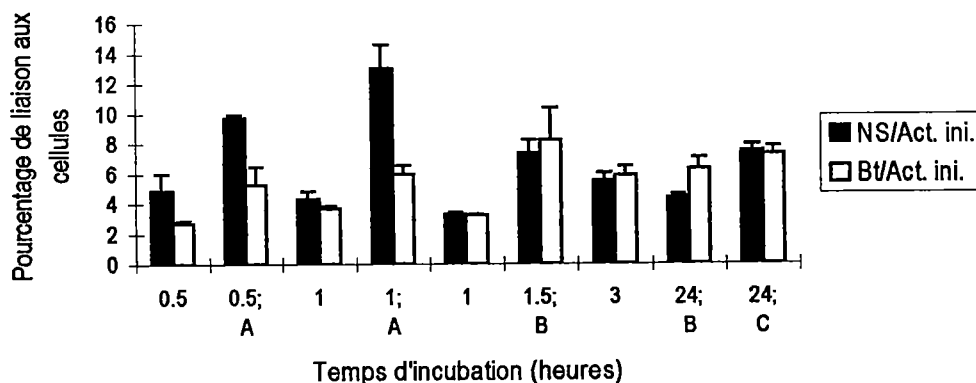


Figure 52. Liaisons *in vitro* de l'Antarelix iodé aux cellules tumorales EMT-6 en pourcentage de l'activité initialement incorporée. Étude effectuée sur des cellules en pétris à 4 degrés Celsius. Les temps d'incubation sont suivis des différentes conditions d'incubation indiquées par les lettres A, B et C: A, jeûne sérique de 24 heures avant incubation; B, Cellules en pétris rincées avec 1 ml de HBSS (10mM HEPES; 0.1% BSA); C, Cellules en pétris récoltées avec 1 ml de HBSSa + 1 ml de NaOH 1N; blanc, tests effectués dans HBSSa (n = 3).

La figure 52 montre bien que la grande majorité des résultats tend vers le non spécifique, à l'exception de ceux faits à 24 heures rincées avec 1 ml de HBSS (B). Pour augmenter la possibilité de résultats positifs (liaisons spécifiques), les cellules ont été récoltées en présence d'albumine bovine et les pétris ont bien été rincés à l'aide, en plus, de 1 ml de NaOH. Les résultats ont montré, contrairement aux aspirations, de moins bonnes liaisons (figure 52; indice C).

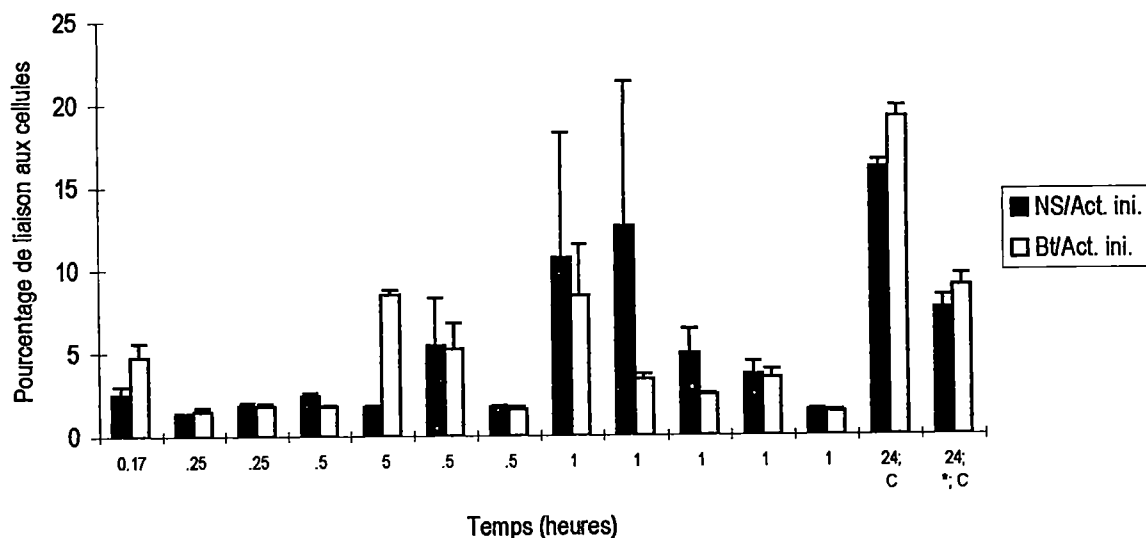


Figure 53. Liaisons *in vitro* de l'Antarelix iodé aux cellules tumorales EMT-6 en pourcentage de l'activité initialement incorporée. Étude effectuée sur des cellules en pétris à 37 degrés Celsius. La lettre C signifie que les échantillons ont été récoltés avec 1 ml de HBSSa + 1 ml de NaOH 1N; l'astérisque (*) correspond à l'incubation fait à 20 degrés Celsius; les blancs (absence de lettre), signifie que les tests ont effectués dans du HBSSa (n = 3).

La figure 53 montre une série de tests effectués en milieu HBSSa (voir section II.B). Les observations tendent, une fois de plus, à démontrer une plus grande non spécificité des liaisons de l'Antarelix iodé aux cellules EMT-6. Les résultats obtenus pour les incubations de 30 minutes divergent, à un endroit seulement, favorablement pour les liaisons spécifiques aux cellules. Ces résultats viennent appuyer la thèse que le produit est inadéquat pour les cellules tumorales EMT-6, ou que ces dernières ne possèdent pas, ou plus, de récepteurs GnRH spécifiques à la LHRH et à ses analogues.

Afin de vérifier si les résultats négatifs obtenus à 37 degrés Celsius seraient reliés à une internalisation du produit iodé par les récepteurs transmembranaires visés, les cellules EMT-6 ont été fragmentées et seulement les membranes cellulaires de ces dernières ont été récupérées. La figure 54 représente les études de liaisons membranaires effectuées à 4 degrés Celsius, par la méthode de centrifugation, et d'autres à 20 degrés Celsius, par filtration.

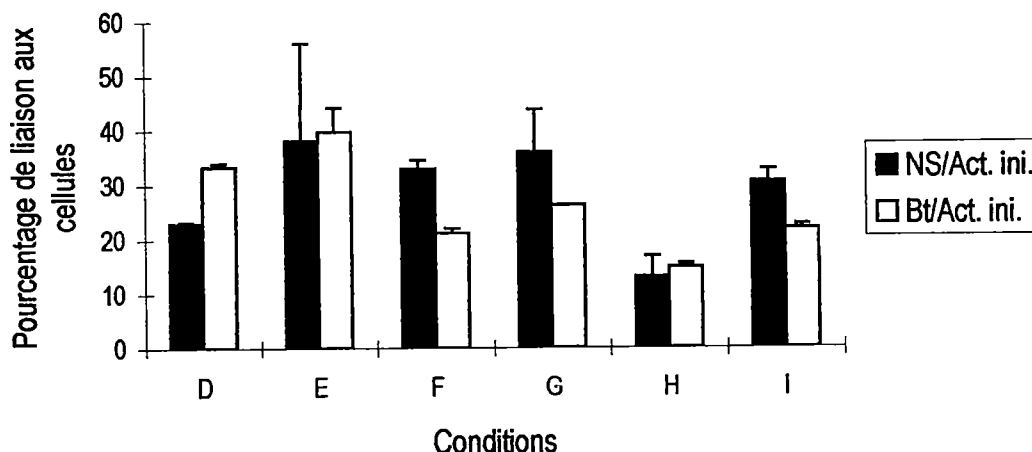


Figure 54. Liaisons *in vitro* de l'Antarelix iodé aux membranes des cellules tumorales EMT-6 en pourcentage de l'activité initialement incorporée. Étude effectuée à 4 degrés Celsius pour une période de 90 minutes. Les conditions correspondent à: D, incubation fait dans tampon Tris (10mM; pH 7.7; 0.3M sucrose; 1mM MgCl₂; 1mM Dithiotréitol); E, tubes rincés au BSA et séchés; F, tubes traités à l'huile de silicone (0.05%) et séchés; G, tubes traités à l'huile de silicone (0.05%), rincés au BSA et séchés; H, test fait par filtration; I, incubation à 20 degrés Celsius et produit récolté par filtration (n = 3).

La figure 54 montre que les membranes des cellules EMT-6 sont indépendantes des différentes conditions d'incubation utilisées. L'ajout de BSA n'a en aucun cas aidé à l'obtention d'une diminution des liaisons non spécifiques aux membranes cellulaires. De plus, l'utilisation de membranes aux lieux de cellules vivantes, n'a pas répondu à l'hypothèse de l'internalisation du produit iodé à travers la membrane cytoplasmique des cellules.

Pour vérifier si la lignée tumorale EMT-6 n'était pas, tout simplement, dépourvue de récepteurs GnRH, une autre souche tumorale mammaire a été parallèlement investiguée. Les cellules MCF-7 ont été étudiées de

la même façon que les EMT-6, cependant, des preuves de l'existence de récepteurs pour un différent analogue de la LHRH étaient disponibles (Vincze *et al.*, 1991).

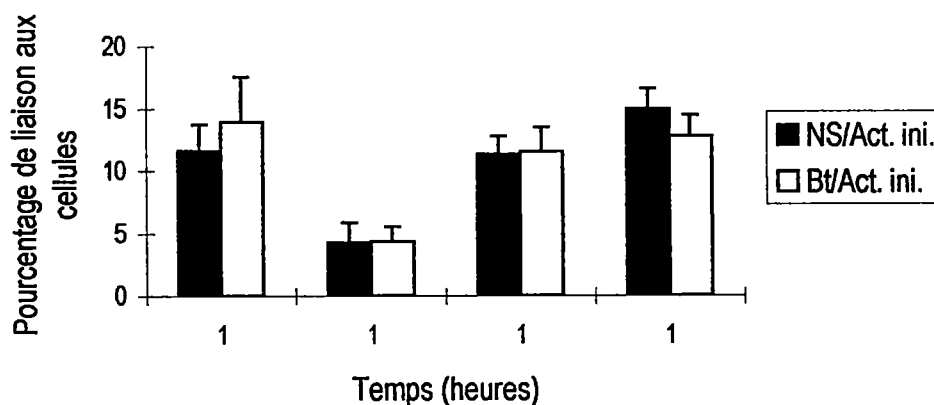


Figure 55. Liaisons *in vitro* de l'Antarelix iodé aux cellules tumorales MCF-7 en pourcentage de l'activité initialement incorporée. Étude effectuée sur des cellules en suspension à 4 degrés Celsius (n = 3).

Les résultats obtenus à la figure 55 et 56 démontrent que les cellules MCF-7 semblent, comme dans le cas des EMT-6, ne pas posséder les récepteurs GnRH visés par l'Antarelix iodé. Une vérification histologique, par le biais d'anticorps spécifiques à ces récepteurs, aurait peut-être pu confirmer la présence ou l'absence des récepteurs GnRH dans les deux types de cellules tumorales utilisés. Cette technique n'a pas été entreprise.

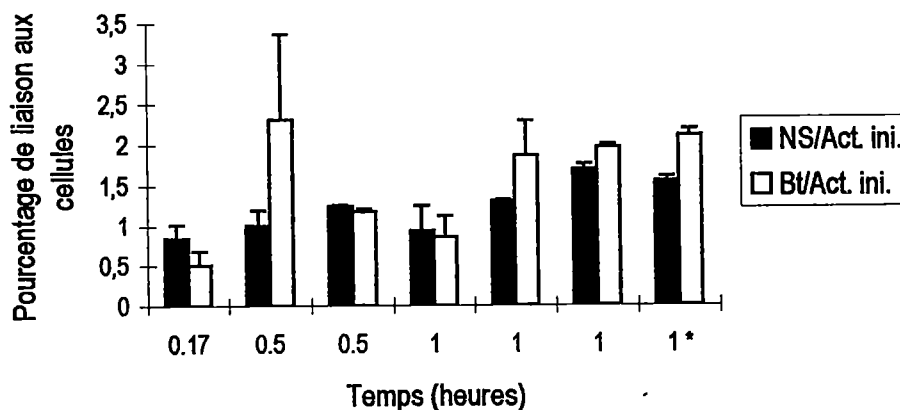


Figure 56. Liaisons *in vitro* de l'Antarelix iodé aux cellules tumorales MCF-7 en pourcentage de l'activité initialement incorporée. Étude effectuée sur des cellules en pétri à 37 degrés Celsius (n = 3).

Après n = 32 essais avec les cellules EMT-6 et n = 11 avec les cellules MCF-7, aucun signe de liaison spécifique aux récepteurs n'a été détecté. Les niveaux de liaison non spécifique ont, dans la plupart des cas, démontré être égaux, ou plus important que ceux indiquant les possibles liaisons.

III.C Autres résultats

III.C.1 Test de stabilité *in vitro* de l' ^{125}I -Antarelix

Un test sur TLC a été effectué (voir section II.C.1) pour vérifier la stabilité du produit marqué. Cette étude a permis d'évaluer si les conditions de travail s'effectuaient dans un environnement où l'analogue iodé était stable et pur. La figure 57 confirme la stabilité du produit iodé après stockage à 4 °C après une période d'entreposage en solution de 60 jours. Le Na^{125}I migre allègrement lorsque la solution de migration est le PBS, tandis que l'Antarelix iodé reste à la base du TLC. Notez que le Na^{125}I représente un échantillon d'iode radioactif pur et non l'iode libre retrouvé dans le produit après remisage. L'iode libre retrouvé dans l'échantillon d'Antarelix iodé suit le même cheminement que le Na^{125}I . Il est en quantité trop faible pour être significatif, et n'apparaît pas à la figure 57.

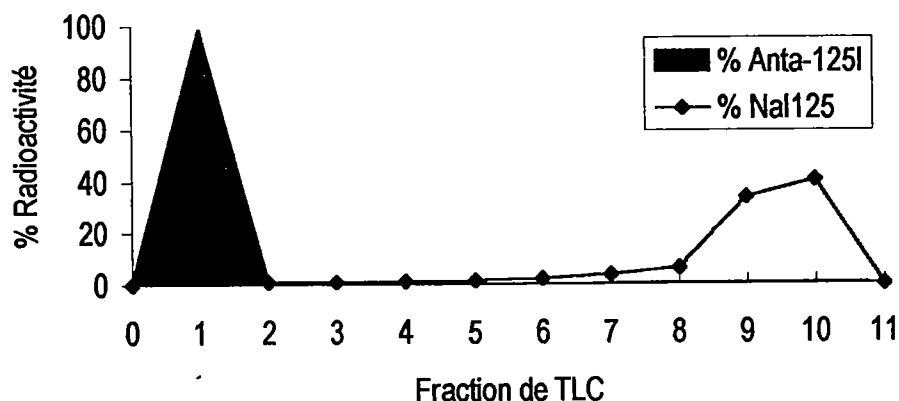


Figure 57. Chromatographie sur couche mince (TLC) dans le PBS.

IV. Discussion

IV. Discussion

IV.A La Chimie

IV.A.1 Chimie de l'iodination des peptides

Plusieurs opinions divergent sur le mécanisme chimique de la réaction d'iodination. Seevers et Counsell (1982) soutiennent que la chloramine-T, en solution aqueuse, forme de l'hypochlorite (HOCl) qui serait la forme oxydative agissant sur l'iodure de sodium (NaI) pour donner une espèce électrophile de l'iode (H_2OI^+). Cette dernière serait la *forme active* de l'iode responsable de l'étape finale de l'iodination. Par contre, Wilbur et ses collègues (1992) émettent que la *forme active* de l'iode serait en fait le monochlorure d'iode (ICl). D'un autre côté, Hussain et ses collègues (1993) soutiennent que la chloramine-T implique la conversion de l'iodure radioactif en iode diatomique (I_2). En somme, on peut conclure que la chloramine-T donne plusieurs réactions secondaires telle que la formation de I_2 , de ICl et de H_2OI^+ . Cependant, seulement l'iode oxydé; le ICl qui possède une polarité partiellement positive sur l'atome d'iode (Seevers et Counsell, 1982) et H_2OI^+ qui est produit de la réaction du I_2 et du H_2O (Hughes *et al.*, 1957) (fig. 13), réagissent sur le groupement phénol de la tyrosine. Le pH est aussi un élément majeur de la réaction d'iodination; à pH moyen (~6) H_2OI^+ est la principale *forme active* de l'iode, et à pH élevé (~8) la concentration de H_2OI^+ diminue et le ICl prédomine (Sonoda et Schlamowitz, 1970).

La chloramine-T (sodium N-chlorotoluènesulfonamide) a servi d'agent oxydant pour l'iodination des peptides. Cet agent d'oxydation est reconnu pour sa grande utilisation à radioioder différentes molécules biologiques tel que le résidu tyrosine, reconnu pour son affinité à l'iodination (Tsomides et Eisen, 1993).

Malgré la disponibilité des groupements phenyl, indole et imidazole, où une halogénéation à un niveau moindre est possible, l'iodination se fait principalement sur la tyrosine sous forme du 3-monoiodotyrosine

(Karonen *et al.*, 1990). La forme diiodée de la tyrosine (3,5-diiodotyrosine) peut aussi être produite, mais ce produit sera en minorité sur la forme monoiodée.

Plusieurs chercheurs ont radioiodé différents types de molécules et ont obtenu divers rendements. Par exemple, Vakkuri *et al.* (1984) ont marqué à l'iode la mélatonine et ont remarqué un rendement d'incorporation de l'iode allant de 20 à 30% en utilisant 2.5 mg d'iodogène. D'autre part, Hunter et Greenwood (1962) affirment l'iodination de l'hormone hGH, avec une efficacité de marquage, de 60 à 75% en utilisant la chloramine-T comme agent oxydant. Salacinski *et al.* (1981) ont affirmé que l'iodination de la Leu-enkephaline, un pentapeptide dépourvu de résidu tryptophane dans sa séquence, peut incorporer jusqu'à 95% de l'iode radioactive; avec 1 mCi de Na^{125}I , 1 mg d'iodogène et 5 nmole de peptide. Ce rendement diminue respectivement à 75% et à 67% lors de l'utilisation de la chloramine-T et du lactoperoxydase comme agent d'oxydation. D'autre part, Marshall et Odell (1975) disent avoir marqué à l'iode la LHRH avec un succès d'incorporation de l'iode de 55%. Différents facteurs sont à la base de la réussite d'un marquage. Il faut d'abord connaître les caprices de la molécule à ioder (les groupements fragiles qui peuvent réagir, la structure tridimensionnelle, etc.) et les sites d'iodination possible. Les conditions physiques et chimiques de la réaction sont très importantes; en plus du pH de la solution de réaction, il est important de considérer la quantité de peptide utilisé, la quantité d'agent oxydant et bien sûr celle de l'iode.

Pour une quantité 0.03 μmole de peptide (26 μg de MK-678; 26 μg d'Hexaline; 44 μg d'Antarelix), 500 μCi de Na^{125}I est ajouté pour l'iodination, ce qui donne un rapport de 130:1 pour les peptides et d'iode-125 respectivement (voir la feuille de calcul à l'Annexe 2). La concentration du Na^{125}I est un facteur important dans la détermination du rendement du marquage; si elle est moins de 100 mCi/ml, le rendement sera diminué (Bolton et Hunter, 1973). Dans cette étude elle était effectivement de 100 mCi/ml.

i) Le MK-678 iodé

Dans le cas de l'iodination du MK-678, la purification représentée à la figure 23 montre une bonne séparation de l'analogue iodé offrant ainsi un produit pur communément appelé; "carrier free". Les résultats obtenus lors de l'étude pharmacocinétique du MK-678 ont démontré une très bonne stabilité *in vivo* de l'iode du produit marqué. Cette stabilité dépend probablement en partie de la structure circulaire que possède ce peptide. Cette particularité fait que le groupement tyrosyl se situe dans la périphérie de la molécule permettant un dégagement maximal du site de marquage. Étant donné qu'un atome d'iode est d'une grosseur sensiblement comparable à un groupement phenyl (Tsomides et Eisen, 1993), l'emplacement du groupe tyrosyl est d'une priorité fondamentale pour qu'il y ait une bonne iodination. La radioiodination du MK-678 donne un rendement de 16% d'incorporation de l'iode sur la quantité initiale du radioisotope présent. Dans des conditions où la concentration de chloramine-T est 10 fois plus importante que celle du peptide, comme c'est le cas ici, un maximum d'incorporation d'iode peut être atteint; tout dépendant de la quantité d'iode présent, du pH, et du temps d'exposition à la chloramine-T (Sonoda et Schlamowitz, 1970). Le pH a été fixé 7.5 pour; éviter le plus possible de dénaturer la molécule à cause de conditions trop acides ou trop basiques, et pour optimiser l'incorporation de l'iode au groupement tyrosine (Salacinski *et al.*, 1981). La quantité d'iode par rapport à celle du peptide aide à obtenir une seule source de peptide marqué, c'est-à-dire la forme moniodée (Sonoda et Schlamowitz, 1970). En ce qui concerne le temps d'incubation, il a été fixé à 15 minutes. Ce temps n'est pas le temps idéal pour un maximum d'incorporation d'iode, mais il réduit les risques d'oxydation du peptide qui peut survenir au niveau de la tryptophane sous les conditions présentes (Alexander, 1973).

ii) L'Hexarelin iodé

Malgré la disponibilité des groupements phenyl et tryptophanyl, où une halogénéation à un bas niveau est possible (Brunings *et al.*, 1947), nos résultats de chromatographie (fig. 24) démontrent que le produit iodé de l'Hexarelin est sans doute sous forme de 2- et de 5-moniodohistidine (le pic majeur situé à ~30

minutes est en réalité 2 pics d'intensité quasi égale). On peut aussi distinguer un 3^e pic radioactif (~34 minutes) qui pourrait représenter la forme diiodée de l'histidine. Cette forme diiodée serait la 2,5-diiodohistidine. Cependant, dû aux extrêmes conditions d'oxydation nécessaires à cette réaction, au lieu d'ioder des groupements moins réactifs tels la tryptophane, une destruction de cette dernière est possible (Hughes *et al.*, 1957; Alexander *et al.*, 1973). La tryptophane est oxydé dans un milieu de pH 4 à pH 7.5 par la chloramine-T (Alexander *et al.*, 1973), et étant donné que la réaction d'iodination sur l'histidine forme un produit iodé qui augmente de concentration avec une augmentation de pH, l'oxydation de la tryptophane peut être réduite à un minimum. Tsomides et Eisen (1993) rapportent qu'à pH 9, le produit iodé principal entre l'histidine et la tyrosine se trouve être l'histidine sous la forme de diiodohistidine. Par contre, Wolff et Covelli (1969) soutiennent que la diiodohistidine est principalement formée lorsque la protéine ne contient aucun groupement tryptophane. L'Hexarelin ici en possède deux; une forme originale (L) et une autre modifiée (D) et possédant un groupement méthyle à la position 2 (fig. 15).

De plus, entre les deux pics majeurs de radioactivité, un pic U.V. beaucoup supérieur aux autres est enregistré. Ce dernier est sans aucun doute la représentation du peptide original non marqué. Il est possible que d'autres formes de marquage à l'iode (ex: iodotryptophane), ou des marquages accompagnés d'une dénaturation de la protéine (attaque aux résidus tryptophanes ou bris d'un lien peptidique), ont eu lieu. Ceci expliquerait en partie l'observation faite à la figure 24 des nombreuses détections U.V. Tsomides et Eisen (1993) ont eux aussi obtenu une mixture de pics complexe qu'ils ont attribué à des dommages oxydatifs au niveau du groupement indole de la tryptophane. Alexander (1973) cite quatre facteurs affectant l'oxydation de la tryptophane lors de l'iodination d'un peptide ou d'une protéine: le pH, la solution de réaction pour l'iodination, la concentration relative de tryptophane et des autres acides aminés telle la tyrosine et la disponibilité spatiale des résidus.

Les conditions dans lesquelles l'iodination de l'Hexarelin ont eu lieu (pH 7.5), laissent la possibilité que la tryptophane soit attaquée (Wolff et Covelli, 1969). Les différentes variables de la réaction ont été évaluées

de façon à favoriser le maintien de l'intégrité biologique du peptide, au lieu de maximiser l'iodination au dépend du premier.

La radioiodination de l'Hexarelin donne un rendement d'incorporation d'iode radioactive de 6%. Cette valeur est représentative de l'iodination d'un fragment peptidique ne possédant pas de groupement tyrosine. Malgré sa disponibilité, le résidu histidyl est très peu utilisé comme molécule cible, dû à sa pauvre affinité pour l'iodination. Deux grandes difficultés peuvent venir contrer cette iodination: (1) La résistance particulière de l'histidine à former un lien carbone-iode sous ces conditions; et (2) la solubilité de l'iodohistidine en solution aqueuse (Brunings *et al.*, 1947). D'autres facteurs à considérer comme les plus importants aux conditions d'iodination de l'histidine sont les propriétés structurales de la protéine et surtout les propriétés intrinsèques du résidu, c'est-à-dire, la réactivité du groupement imidazole de l'histidine (Wolff et Covelli, 1969). Pour en finir, Bolton et Hunter (1973) rapportent que la méthode d'iodination par la chloramine-T pourrait être inadéquate pour des peptides manquant le résidu tyrosyl.

iii) L'Antarelix iodé

Nos résultats démontrent que le produit iodé de l'Antarelix est probablement sous forme de 3- et de 5-monoiodotyrosine (fig. 25). On peut aussi distinguer un 2^e pic radioactif (~50 min.) qui pourrait représenter la forme diiodée de la tyrosine. La disponibilité de plusieurs groupements aromatiques (naphthyl, pyridyl et chlorophenyl), a démontré que des iodination autres que secondaires (diiodination), c'est-à-dire tertiaires, sont possibles (fig. 25). De plus, un pic absorbant dans U.V. (~38 min.), n'ayant aucune radioactivité reliée, est enregistré et est probablement la représentation du peptide original non marqué. Si par contre, des marquages accompagnés d'une dénaturation de la protéine (attaque aux résidus ou bris d'un lien peptidique) ont eu lieu, elles sont en concentrations négligeables et non détectables à la sensibilité préétablie des instruments. Ou, ils sont tout simplement éliminés au tout début lors de la séparation par HPLC, ou alors ils se perdent dans le bruit de fond.

Les résultats obtenus lors de l'étude pharmacocinétique (fig. 40, tab. 3) de l'Antarelix ont démontré une très bonne stabilité du produit iodé *in vivo*. Cette stabilité dépend en majeure partie de la présence du résidu tyrosyl, qui est parmi tous, le plus réactif et aussi le plus stable en raison de son lien covalent avec l'iode (Karonen, 1990). Bien sûr, d'autres groupements peuvent réagir grâce à l'iode activée (H_2OI^+), mais malgré la disponibilité de ces groupements mentionnés, sur lesquels des halogénations à des niveaux inconnus seraient possibles, l'iodination se fait principalement sur la tyrosine sous forme de 3- et/ou de 5-monoiodotyrosine (Karonen *et al.*, 1990). La forme diiodée de la tyrosine (3,5-diiodotyrosine) est aussi probablement produite (fig. 25) et d'autres types d'iodinations pourraient avoir lieu dus aux extrêmes conditions d'oxydation nécessaires à cette réaction (Karonen *et al.*, 1990). Les résidus autres que la tyrosine par contre pourraient souffrir des conditions d'oxydation à laquelle ils sont soumis. D'un autre point de vue, Jorgensen et Slade (1971) ont démontré que malgré certaines conditions rigoureuses et inadéquates pour les molécules biologiques, seule la tyrosine est iodée et non le groupement naphthyl. Pour ce qui concerne les autres résidus aromatiques, chlorophenyl et pyridyl, aucune information pertinente n'a pu être trouvée dans la littérature.

IV.A.2 Chimie de chélation

La chélation est un moyen efficace de jumeler un radionucléide à une molécule d'intérêt biologique, dans notre cas un peptide, lorsque cette molécule ne possède aucun site permettant le marquage à l'iode, ou lorsqu'un autre type de radionucléides que l'iode est désiré, que ce soit pour des raisons de fenêtres énergétiques, ou financières. Plusieurs molécules peuvent être exploitées et utilisées comme agent de chélation. Le DTPA est probablement de loin, le chélateur le plus utilisé pour le marquage des molécules biologiques (peptides, protéines, anticorps, etc.) à l'indium. Un exemple bien connu est l' $[\text{}^{111}\text{In-DTPA}]$ -Octréotide décrit par Bakker et collègues (1991) pour le diagnostic chez les patients atteints du cancer. Le substrat B&H en est un de plus qui facilite le marquage des molécules biologiques, à l'iode radioactif (Bolton et Hunter, 1973). Finalement, le dextran qui, grâce à sa chaîne de polymères, permet le marquage

au ^{99m}Tc ainsi qu'à d'autres types de radionucléides semblables (possédant les mêmes exigences chimiques) (Holmberg *et al.*, 1994).

Une chose les relie tous les uns aux autres, leur mécanisme de liaison au peptide. Dans les trois cas, la réaction se fait par substitution nucléophile (Solomon et Fernandez, 1988), sur le groupement carboxylique des agents de chélation, par les amines libres retrouvées chez le peptide. Cette réaction forme un lien covalent et stable *in vivo* qui permet l'incorporation d'un radionucléide pour effectuer des études diagnostiques ou même thérapeutiques d'imagerie médicale.

i) L'Hexarelin-DTPA

La réaction se produit aux sites dianhydreaux du DTPA en observant principalement, dans les conditions données, la formation majeure d'un lien à l'amine ϵ et d'un second à l'amine α . Il n'est pas impressionnant de remarquer une très forte quantité de peptides beaucoup plus tard dans l'élution (43 minutes) qui pourrait représenter la forme doublement liée (2 molécules de DTPA) du peptide. Cependant, d'autres liens ont pu se former et les fractions observées lors de la purification peuvent être tout autres que les produits hypothétiques (fig. 17). Le DTPA dianhydreaux possède deux sites réactifs et, pour cette raison, la formation de dimères est possible. Toutefois, les conditions à laquelle la réaction a eu lieu ne favorisent pas cette conclusion et les produits hypothétiques mentionnés en II.A.4 devraient représenter la réalité malgré les résultats non concluants des tests radioimmunologiques. Bakker *et al.* (1991) ont pour leur part obtenu des résultats de monoliasion du DTPA à l'Octréotide de 10% sur la quantité initiale de peptide. Ceci est principalement dû au ratio des substrats initialement utilisés; un ratio de 1:1 de DTPA:peptide, respectivement. Ici le même ratio est de 10:1 ce qui diminue énormément les chances de former des dimères (2 molécules peptidiques pour un DTPA).

ii) L'Hexarelin-B&H

Le produit de Bolton et Hunter (N-hydroxysuccinimidyl p-hydroxyphénylpropionate) possède dans sa structure un groupement ester qui est propice à la réaction de substitution nucléophile (Solomon et Fernandez, 1988). Cette réaction laisse sur la molécule peptidique la fraction phényl qui peut être iodée à l'avance et servir de chélateur radioactif à la molécule peptidique (Langone, 1989). La chimie de l'iodination du B&H avant la réaction de cette dernière au peptide (résultats non présentés) ainsi que son incorporation à l'Hexarelin (molécule sensiblement fragile; voir section IV.A.1.ii), ont causé de sérieux maux de tête lors des étapes de purification. C'est pour ces raisons que seuls les produits non iodés ont été étudiés. De plus, la chromatographie n'est pas des plus convaincantes et exprime de façon indirecte la fatigue ressentie par la colonne (ODS, Beckman) lors des étapes de séparation. Néanmoins, les fractions pouvaient être séparées adéquatement. Bolton et Hunter (1973) ont obtenu une incorporation de l'acide 3-(4-hydroxyphényl) propionique, de l'ester hydroxy-succinimide, allant de 13 à 53% (moyenne de 32%). De notre côté, la figure 29 montre bien une incorporation "potentielle" de plus de 75%. Cette différence majeure peut être expliquée par l'accessibilité des différents groupements aminés qui peuvent réagir et former des liens stables. Dans le cas de la hGH (Bolton et Hunter, 1973), plusieurs de ces amines, situés sur les résidus lysines, sont probablement difficile d'accès à cause de la structure tridimensionnelle que prend la molécule. Ici l'Hexarelin ne possède que six acides aminés, ce qui maximise les chances de liaison.

iii) L'Hexarelin-Dextran

Le dextran possède une série de groupements hydroxyls pouvant être transformés en liens réactifs pour la liaison aux amines peptidiques. Il est par ailleurs clair que plusieurs peptides peuvent se lier au dextran formant ainsi de nombreuses chaînes secondaires peptidiques (Hexarelin) à une seule molécule de dextran. Le nombre de molécules peptidiques peut varier par molécule de dextran et l'utilisation de la colonne de purification PD-10 n'étant pas de très bonne résolution, il est impossible de séparer ces

différents produits (la purification par HPLC étant fortement déconseillée pour la durabilité des colonnes de séparation disponibles). Il est toutefois clair que l'évaluation de la quantité de dextran activé, étant maximisée et dans les limites du réel, un maximum de liaison simple de l'Hexarelin au dextran a pu être atteint.

Le dextran a été une tentative expérimentée afin de confirmer la reproductibilité des résultats obtenus avec la somatostatine (Holmberg *et al.*, 1994), mais avec notre analogue de GHRP. La purification accomplie montre qu'une quantité importante de dextran libre a pu se joindre aux fractions du Hexarelin-Dextran récoltées. Cependant, l'élément important de cette purification est l'absence de peptide libre dans les fractions récoltées du complexe pour les études de RIA.

IV.A.3 Chimie de marquage direct

i) L'Antarelix- ^{111}In

Une tierce alternative semblait prometteuse dans le marquage des peptides pour le dépistage du cancer; celle du marquage directe. Par l'exploitation d'une structure interne, comparable à celle d'un agent de chélation étranger à la molécule, un peptide pourrait être marqué radioactivement avec des radioisotopes plus intéressant du point de vue énergétique, chimique et financier. Cette méthode offrait une facilité chimique (une étape) pour un groupe de peptide ou de protéine possédant des caractéristiques semblables à celles de l'Antarelix. L'élément le plus important de ce concept se trouve être la terminaison triplement aminées de peptide. Trois groupements amines (fig. 20) pourraient offrir les électrons nécessaires à l'incorporation d'une molécule acceptrice; indium, technétium, etc. Il suffit que les trois donneurs d'électron soient en position pour que le radioisotope puissent s'incorporer à la molécule peptidique. Le DMF a servi de médiateur pour forcer la molécule à prendre la conformation désirée.

En ce qui concerne l'analogue de la LHRH, l'Antarelix, sa structure a été pensée et synthétisée afin d'optimiser sa performance *in vivo* sur l'être humain afin d'inhiber la sécrétion de la LH (Coy *et al.*, 1982). L'exploitation de sa terminaison aminée comme chélateur interne semblait ouvrir une nouvelle avenue dans le marquage radioactif des peptides. Mais malheureusement, les résultats à la figure 31 n'ont pu être reproduits. La seule explication applicable aux résultats obtenus ultérieurement serait que ce qui apparaît serait dû à un artefact et non à une liaison. Cette hypothèse est difficile à appuyer étant donné que des essais dans différentes conditions, au même moment, ont été effectués et ne démontraient aucune liaison, tandis que le modèle suivi à la section II.A.6 démontre le contraire.

IV.B La biologie

IV.B.1 Études pharmacocinétiques

La série d'études biologiques de pharmacocinétique a été effectuée afin de déterminer la distribution tissulaire des différents produits développés, pour évaluer la possibilité de ces derniers à devenir des agents diagnostiques pour l'imagerie médicale dans le dépistage des tumeurs.

i) Le MK-678 iodé

Le MK-678 iodé est un bon traceur *in vivo* avec une très bonne stabilité et une bonne clairance sanguine (voir Annexe 1). Il est principalement filtré du volume sanguin par le foie et se retrouve dans les intestins dès les 30 premières minutes après l'injection par voie intraveineuse. Cependant, d'autres études biologiques devraient être entreprises avec une lignée tumorale comprenant des récepteurs sensibles à ce peptide. Malheureusement, les cellules tumorales utilisées (EMT-6) ne contiennent probablement aucun récepteur compatible, contrairement démontré sur d'autres types tumoraux (Reisine *et al.*, 1990). Les souches tumorales utilisées ne laissaient croire en aucun temps qu'elles étaient dépourvues de

récepteurs. Ces résultats ne nous donnent aucune indication sur l'éligibilité de ce produit à servir comme traceur tumoral à la détection des cancers chez l'humain.

ii) L'Hexarelin iodé

Les résultats obtenus lors de l'étude pharmacocinétique de l'Hexarelin iodé (fig. 36, tab. 2) ont démontré une pauvre stabilité du produit iodé *in vivo* représentée par le haut niveau de radioactivité retrouvé à la thyroïde (toujours par rapport au Na¹²⁵I pure). Cette piètre stabilité de la liaison de l'iode radioactive dépend en majeure partie de l'absence de résidu tyrosyl. L'Hexarelin iodé est un pauvre traceur *in vivo* avec une clairance sanguine plus faible que celle observée pour le MK-678 (Annexe 1). Il est à 60% filtré par les reins et se retrouve en majeure partie dans l'urine. L'excrétion est presque totale dès les 24 premières heures après l'injection i.v. Les données obtenues lors de l'étude de la biodistribution montrent bien que le produit est aussi constamment éliminé par le foie sur la période entière de l'étude (24 heures). Ces résultats pourraient néanmoins représenter le mouvement thyroïdien de l'iode libre dans l'organisme de la souris, faussant complètement les observations. Il ne faut surtout pas oublier que le produit injecté était sous une forme hétérogène et que la dualité dans l'excrétion peut facilement être expliquée par ce phénomène.

Il doit donc être clair que des études futures, *in vitro* et *in vivo*, doivent être faites pour essayer de corriger le manque de stabilité du produit iodé en évitant d'utiliser des moyens chimiques trop rudes pour la molécule, ou en employant une nouvelle méthode de marquage ne requérant pas la présence de tyrosine. En plus, d'autres études biologiques devraient être entreprises avec une lignée tumorale comprenant des récepteurs sensibles à ce peptide. Malheureusement, les cellules tumorales utilisées (EMT-6) ne contiennent probablement aucun récepteur compatible et aucune souche cellulaire n'est fait mention dans la littérature possédant des récepteurs identifiés de GHRP. Donc l'étude effectuée sur la lignée utilisée ne donne aucune indication sur l'éligibilité de ce produit à servir comme traceur tumoral à la détection des cancers chez l'humain.

iii) L'Antarelix iodé

L'Antarelix iodé est relativement un bon traceur *in vivo* avec une bonne stabilité. Il est principalement excrété par le foie et se retrouve en majeure partie dans les selles dès les 12 premières heures après l'injection par voie intraveineuse (fig. 40, tab. 3). Sa clairance sanguine (fig. 41) suit un modèle à deux exponentielles, et se fait au rythme de ~4.5 ml de sang/min (Annexe 1). D'autres études biologiques devraient être entreprises avec une lignée tumorale comprenant des récepteurs sensibles à ce peptide. Malheureusement, les cellules tumorales utilisées (EMT-6) ne contiennent aucun récepteur compatible ou elles en contiennent en quantité trop faible pour être évalués. Ceci ne nous donne aucune indication sur l'éligibilité de ce produit à servir comme traceur tumoral à la détection des cancers chez l'humain.

Plusieurs aspects de cette molécule biologique sont à la base de son intérêt pour l'imagerie médicale. Premièrement, c'est un peptide très stable; une fois en solution, le peptide reste stable plusieurs semaines à basse température (fig. 57); deuxièmement, elle se travaille bien en milieu organique; troisièmement, elle est facilement marquable à l'iode grâce à sa tyrosine retrouvée en position 5 (fig. 12).

IV.B.2 Essais radioimmunologiques (RIA)

La méthode de RIA est très utile pour l'identification de l'activité d'un agent biologique déterminé afin de mesurer le niveau de conservation de l'intégrité d'un site précis. Deux anticorps ont été développés à la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal pour les deux terminaisons (amine et carboxylique) du peptide Hexarelin. Ces deux anticorps semblaient très utiles pour des études d'identification des sites de liaison des différents substrats réagis à l'Hexarelin. Ce peptide possède deux groupements amines, un à la position α et l'autre à la lysine (position ϵ), pouvant réagir et former différents produits. C'est dans cet optique d'identification que cette technique a été exploitée.

i) L'Hexarelin-DTPA

La possibilité que le produit complexé Hexarelin-DTPA soit intéressant pour le dépistage des tumeurs reste à être étudié. Le modèle tumoral utilisé ne semblait pas convenir au besoin recherché, malgré les relativement hauts ratios aux différents tissus (voir tableau 5, p. 66). La figure 44 montre clairement le haut niveau de radioactivité fixé aux reins et l'absence de radioactivité tumorale. Cependant les hauts niveaux retrouvés aux reins restent à être plus profondément étudiés afin de connaître le mécanisme responsable de cette spécificité. L'Hexarelin, un GHRP relié dans sa fonction à la GHRH, pourrait avoir un site de liaison particulier au niveau rénal comme l'ont démontré Forssell-Aronsson et ses collègues (1995) pour la somatostatine. Il est connu que cette dernière possède un effet antidiurétique et que la section médullaire du rein possède de hautes densités de récepteurs pour ce peptide, et d'autres à plus faibles densités distribuées de façon non homogène au niveau du cortex, c-à-d. aux tubules proximaux et non aux glomérules (Reubi *et al.*, 1993b). Ceci laisse la possibilité que d'autres hormones (GHRP, GHRH) peuvent agir de façon connexe aux mêmes sites pour peut-être contrer l'effet de la somatostatine. Pour ces raisons, l'analogue Hexarelin-DTPA devrait être étudié plus intensément afin d'éclaircir ce phénomène. Notons que, Adrian *et al.* (1994) n'ont, pour leur part, découvert aucune fixation de l'analogue de la somatostatine (^{111}In -DTPA-(D)-Phe¹-Octréotide) au niveau du rein chez l'humain.

ii) L'Hexarelin-B&H

Les résultats obtenus montrent bien (fig. 49) que les fractions 4 et 5 ont conservé une affinité de liaison respective de plus de 30% et de 20% aux deux anticorps, tandis que les fractions 2 et 3 l'ont presque totalement perdue. Dans le cas où il y a conservation de l'intégrité biologique du peptide, les expériences n'ont quand même pas permis la classification des types de liens entre le peptide Hexarelin et le chélateur B&H. Le fait qu'il y ait plusieurs produits lors de la chromatographie suggère la présence de plusieurs réactions entre les deux substrats. Cependant, les résultats sèment le doute en ce qui concerne la nature des complexes Hexarelin-B&H; la détermination d'une liaison α plutôt que ε ne peut être évaluée. Si les

fractions 2 et 3 avaient gardées une affinité à seulement un des anticorps, l'identification du site de liaison aurait pu être déterminé. Ces fractions auraient pu, dans le cas échéant, être investiguées plus profondément afin d'exploiter au maximum leurs potentiel diagnostique pour le dépistage du cancer. Malheureusement, il en est tout autrement, et c'est pour ces raisons que cette section du projet à été mise de côté.

Toutefois, malgré les piètres conclusions tirées des études faites sur les complexes Hexarelin-B&H, les autres études radioimmunologiques effectuées pour les complexes Hexarelin-DTPA et celles du Hexarelin-Dextran ne viennent en aucun cas éclaircir le doute déjà existant (fig. 48 et 50). Des études spectrométriques de masse des complexes de DTPA n'ont absolument rien amené de concluant (résultats non présentés). Par contre, les études d'imagerie SPECT faites sur le rat (résultats non présentés) ont confirmé les observations faites chez la souris concernant la fixation rénale du produit marqué à l'indium.

Afin de déterminer la molarité des fractions récoltées, un standard a été utilisé comme point de référence. Si, par malheur, une erreur s'est glissée dans le calcul des molarités des supposés complexes, il est fort probable que les concentrations ont été exagérées. De plus, afin d'établir une concentration probable, étant donné que les fractions sont des supposées complexes peptide-agent chélateur, des poids moléculaires ont été attribués à chacun. Ces valeurs ont été allouées de façon directe; par l'ajout du poids moléculaire correspondant à une liaison simple ou double du chélateur. Il est connu que la lysine possède un groupement amine plus réactif que celui en positions alpha (Gaudriault et Vincent, 1992). Si un substrat est en excès (tel est le cas pour le B&H, le DTPA et le Dextran), la majorité des produits seront basés sur une seule molécule peptidique (avec une possibilité de deux chélateurs par peptide, et non l'inverse). Donc des poids similaires ont été donnés aux deux premières fractions du Hexarelin-DTPA et deux autres aux Hexarelin-B&H, tandis que des poids plus élevés ont été assignés aux dernières fractions du Hexarelin-DTPA et au Hexarelin-B&H.

Ces facteurs peuvent avoir un effet négatif sur les études entourant les produits synthétisés et peuvent contribuer aux conclusions que ces agents d'imagerie sont inadéquats.

iii) L'Hexarelin-Dextran

Le dextran est un agent d'imagerie non envahissant intéressant pour la visualisation de l'anatomie et des mouvements cardiaques. Il fournit une technique diagnostique d'intérêt pour le traitement des désordres cardio-vasculaires (Borer *et al.*, 1977). Le choix du dextran comme agent de chélation se résume à ceci: c'est un agent stable, il lie fortement le radioisotope (^{99m}Tc , ^{186}Re); il possède une méthode de marquage simple (basé sur la réduction de l'isotope), rapide et peu coûteuse; c'est aussi un agent à risque minimal pour le patient. Par contre, le dextran, selon son poids moléculaire, peut rester dans le système sanguin pendant plusieurs heures (Walkley *et al.*, 1976).

Comme observé avec le DTPA, le dextran de poids moléculaire de moins de 40000 est excrété par les reins. Ce qui, comme dans le cas de l'Hexarelin-DTPA, aurait pu démontrer une liaison particulière au niveau rénale. Les résultats de RIA obtenus de l'Hexarelin-Dextran ont ralenti l'enthousiasme entourant ce traceur, et les études pharmacologiques et pharmacocinétiques du produit lié au ^{99m}Tc , n'ont tout simplement pas été entreprises. Le mouvement vers la droite de la courbe d'affinité du produit pour les anticorps confirme la diminution de l'intégrité du produit par rapport au standard. Cette diminution est normale dû à l'énormité du dextran (10000g/mole), par rapport à l'Hexarelin (886g/mole), et ne devrait pas affecter le cheminement de l'exploitation de ce produit vers le développement d'un agent d'imagerie. Cependant, le fait que des résultats semblables aient, une fois de plus, été obtenus pour les deux anticorps, n'aident d'aucune façon à l'identification du site de liaison au peptide. De plus, n'ayant pas de modèles tumoraux adéquats, comme le démontrent les résultats de Hexarelin-DTPA, il n'a été d'aucun intérêt de pousser le développement du Hexarelin-Dextran comme agent diagnostique pour la médecine nucléaire.

Holmberg et ses collègues (1994) ont, eux aussi, eu espoir dans leur analogue de somatostatine liée au dextran et ont obtenu des résultats de liaison tumorale spécifique (3-8 %) beaucoup inférieurs à d'autres types d'analogues de somatostatine marquée (Bakker *et al.*, 1991).

IV.B.3 Études de liaison *in vitro*

La LHRH (GnRH) et ses analogues sont connus comme étant des ligands agissant, aux niveaux des cellules tumorales cibles, par un mécanisme de liaison impliquant des récepteurs transmembranaires. Il est donc possible de caractériser différentes lignées cellulaires saines et tumorales pour un traceur défini. En ce qui nous concerne, il est essentiel de savoir si certaines souches tumorales possèdent ou non, les récepteurs nécessaires pour une bonne détection diagnostique.

Pour ce qui est des cellules tumorales EMT-6 (lignée spécifiquement développée pour les souris Balb/C) aucun essai de liaison *in vitro* aux récepteurs de GnRH n'avait été fait auparavant. Les résultats disponibles aux figures 51 à 54, montrent l'inefficacité de l'Antarelix iodé à se lier spécifiquement aux récepteurs de GnRH. Ces observations peuvent contenir plusieurs explications. Entre autres, les cellules EMT-6 pourraient être dépourvues de récepteurs de GnRH, ou en posséder une quantité trop faible pour être détectées. Le traceur pourrait aussi être le facteur limitant dans cette étude. Et finalement un problème technique au niveau du protocole pourrait aussi venir bloquer la détection des récepteurs convoités.

La dualité retrouvée dans les résultats de liaison *in vitro*, entre les cellules EMT-6 et MCF-7 (figures 51 à 56), laisse croire que l'analogue iodé de la LHRH n'est pas adéquat pour de telles expérimentations; plusieurs chercheurs ayant démontrés la présence de récepteurs de GnRH dans plusieurs souches tumorales incluant les MCF-7 (Segal-Abramson *et al.*, 1992; Mullen *et al.*, 1993; Szöke *et al.*, 1994; Vincze

et al., 1991; Yano *et al.*, 1994). Cependant, les résultats de liaison de l'Anatrelix iodé à la glande pituitaire, représentés à la figure 40, indiquent que l'hypothèse d'un traceur inadéquat ne peut être considérée.

Que ce soit lors des études *in vitro*, ou des tests de distributions tissulaires sur des souris portant la souche cancéreuse, la lignée tumorale EMT-6 n'a démontré aucune spécificité à l'Antarelix iodé. Cette souche tumorale, étant d'une origine mammaire, a été considérée comme pouvant posséder les récepteurs de GnRH normalement retrouvés chez plusieurs cellules de même provenance. Les résultats semblent révéler le contraire. Une des raisons pouvant expliquer ces observations peut être la désensibilisation des récepteurs de GnRH qu'aurait pu subir les cellules EMT-6. Cette possible désensibilisation peut être allouée à un usage excessif (plusieurs centaines de division mitotique) des cellules, ou, malgré l'utilisation de protocoles déjà utilisés dans la littérature, à de mauvaises techniques d'évaluation *in vitro*.

En ce qui concerne l'existence de récepteurs de GnRH au niveau des cellules MCF-7, des résultats relativement récents ont démontré l'incapacité de prouver une réelle liaison spécifique d'un analogue antagoniste de la LHRH (Mullen *et al.*, 1993). De plus, la possibilité que l'analogue iodé utilisé ait pu subir une perte d'activité spécifique, ne peut être écartée. Néanmoins, la purification par HPLC (fig. 25) montre bien la facilité à laquelle la séparation du complexe iodé, par rapport au peptide original, s'est faite.

Plusieurs types de cellules ont fait l'objet d'études similaires. C'est le cas des LNCaP (Limonta *et al.*, 1992) et des DU-145 (Dondi *et al.*, 1994), souches cancéreuses de la prostate; des OV-1063, cellules épithéliales humaines des ovaires (Yano *et al.*, 1994); et des HEC-1A, cellules tumorales humaines de l'endomètre (Emon *et al.*, 1993). Ces dernières pourraient être utilisées afin de bien démontrer que les cellules utilisées étaient, ou non, inadéquates. Il ne faut surtout pas espérer trouver des récepteurs, spécifique à un ligand particulier, dans toutes les lignées tumorales. Comme il ne faut pas trop compter sur des observations de liaison au site ultime (glande pituitaire), pour extrapoler ces résultats à d'autres sites secondaires d'intérêt (les tumeurs). Mullen et ses collègues (1993) ont démontré que des analogues

se liant à des récepteurs GnRH du placenta ne se lie pas nécessairement aux récepteurs de l'hypophyse. Marshall et Odell (1975) ont aussi observé une non spécificité de la LHRH iodé au niveau de membranes de la glande pituitaire. Ces observations viennent confirmer le fait que l'analogue de la LHRH, l'Antarelix, est idéal pour cibler la glande pituitaire, et non pour servir de traceur au dépistage de certains types de cancer ailleurs dans l'organisme.

Les résultats obtenus de la liaison *in vitro* jumelés à ceux observés lors des études *in vivo* démontrent l'inefficacité de l'analogue antagoniste de la LHRH, l'Antarelix iodé, à servir d'agent diagnostique pour le dépistage du cancer. Cette conclusion s'applique aux études faites avec les cellules EMT-6, et avec les cellules MCF-7.

Conclusion

L'utilisation des peptides pour le dépistage du cancer est une avenue en pleine expansion et semble être une alternative intéressante pour détecter des tumeurs d'origine multiple. Toutefois, la conception d'un traceur tumoral ne peut être spontanée. Beaucoup de temps d'investigation et de patience doivent être investis afin d'arriver à un modèle profitable. Il est important de bien définir, à l'avance, un modèle tumoral pour s'assurer qu'il possède bien les caractéristiques nécessaires à une étude sur l'utilisation des marqueurs peptidiques. La clef de ce projet dépendait, avant même qu'il prenne forme, de la présence de récepteurs spécifiques aux peptides utilisés.

Comme démontré dans cette rédaction, les cellules utilisées n'étaient pas adéquates à ce type d'étude et si elles démontraient à l'occasion une certaine affinité spécifique pour les cellules, les résultats n'étaient pas reproductibles. Malgré ce fait, certains produits tel que l'Antarelix iodé a démontré une forte liaison aux tissus cibles (hypophysaires), ce qui indique la possibilité d'une détection des cancers reliés à des problèmes au niveau de la glande pituitaire. D'un autre côté, l'Hexarelin-DTPA, et peut-être la forme liée au substrat B&H de l'Hexareline, avec son importante fixation rénale, pourrait servir à certaines études diagnostiques: Par exemple, pour les carcinomes cellulaires rénaux (Reubi *et al.*, 1992), ou pour effectuer des études au niveau de la région médullaire rénale (Reubi *et al.*, 1993b).

Il est important de noter que les peptides utilisés dans ce travail de maîtrise avaient été synthétisés pour remplir des rôles pharmacologiques autres que la détection cancéreuse. Le but était d'exploiter les caractéristiques de ces peptides afin d'en faire, en les modifiant, des agents diagnostiques. Les méthodes, les résultats, et les conclusions tirés suite aux expérimentations sauront, je l'espère, éclairer les prochains candidats qui oseront se lancer dans l'exploitation des peptides pour en faire des agents diagnostiques pour le dépistage du cancer.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr. J.E. van Lier pour la grande autonomie qu'il m'a allouée; sans lui, le projet n'aurait pu prendre forme. Je voudrais également remercier les Drs Nicole Brasseur, Jacques Rousseau et René Ouellette pour leur patience face aux nombreuses questions et pour leur soutien technique.

Je voudrais remercier les Drs Benoît Paquette et J.E. van Lier du Département de médecine nucléaire et de radiobiologie, ainsi que le Dr. Gaétan Guillemette du Département de pharmacologie, à qui a été imposé la tâche ingrate d'arbitre pour ce mémoire.

Je voudrais finalement remercier spécialement Francine Lussier, sans qui l'édification de ce mémoire aurait été beaucoup plus pénible et tous les gens du département pour leur disponibilité, leur amitié et leurs encouragements continus tout au long de ces années.

Bibliographie

Adrian, H.J., Dörr, U., Bach, U., Bihl, H. (1994) *Biodistribution of ¹¹¹In-Pentapeptide and Dosimetric Consideration With Respect to Somatostatin Receptor Expressing Tumor Burden*. Biodistribution and Dosimetry. 18-23.

Alexander, N.M. (1973) *Oxidation and oxidative cleavage of tryptophanyl peptide bonds during iodination*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 54(2), 614-621

Allain, Y.-M., Giraud, B., Labrie, F., Malkani, K., Porter, A.T., Rozan, R. (1994) *Cancer de la prostate: Approches stratégiques et thérapeutique*. (eds) Arnette, Paris. 243-277.

Arner, P.V. *The b3-adrenergic receptor - a cause and cure of obesity*. (1995) The New England Journal of Medicine. 333(6), 382-383.

Arvat, E., Gianotti, L., Di Vito, L., Imbimbo, B.P., Lenaerts, V., Deghenghi, R., Camanni, F., Ghigo, E. (1995) *Modulation of Growth Hormone-Releasing Activity of Hexarelin in Man*. Neuroendocrinology. 61, 51-56.

Arvat, E., Gianotti, L., Grottoli, S., Imbimbo, B.P., Lenaerts, V., Deghenghi, R., Cammani, F., Ghigo, E. (1994) *Arginine and Growth Hormone-Releasing Hormone Restore the Blunted Growth Hormone-Releasing activity of Hexarelin in Elderly Subjects*. J. Clin. Endocrin. Met. 79(5), 1440-1443.

Bajusz, S., Janaky, T., Csernus, V.J., Bokser, L., Fekete, M., Srkalovic, G., Redding, T.W., Schally, A.V. (1989a) *Highly potent metalloptide analogues of luteinizing hormone-releasing hormone*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86,6313-6317.

Bajusz, S., Janaky, T., Csernus, V.J., Bokser, L., Fekete, M., Srkalovic, G., Redding, T.W., Schally, A.V. (1989b) *Highly potent analogues of LH-RH containing D-Phenylalanine nitrogen mustard in position 6*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86,6318-6322.

Bakker, W.H., Krenning, E.P., Breeman, W.A.P., Koper, J.W., Kooij, P.P.M., Lameris, J.S., Reubi, J.-C., Visser, T.J., Lamberts, S.W.J. (1991a) *In vivo use of radioiodinated somatostatin analog: dynamics, metabolism and binding to somatostatin receptor positive tumors in man*. J. Nucl. Med. 32,1184-1189.

Bakker, W.H., Albert, R., Bruns, C., Breeman, W.A.P., Hofland, L.J., Marbach, P., Pless, J., Pralet, D., Stoltz, B., Koper, J.W., Lamberts, S.W.J., Visser, T.J., Krenning, E.P. (1991b) *[¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: Synthesis, radiolabeling and in vitro validation*. Life Sciences, 49,1583-1591.

Bakker, W.H. (1992) *Radiopharmaceuticals for scintigraphy of somatostatin receptor-positive tumors*. Université de Rotterdam. Thèse de Doctorat. University Hospital Rotterdam. Rotterdam. The Netherlands.

- Behre, H.M., Nashan, D., Hubert, W., Nieschlag, E. (1992) *Depot GnRH agonist blunts the androgen-induced suppression of spermatogenesis in a clinical trial for male contraception.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 74,84-90.
- Bischof Delaloye, A., Delaloye, B. (1995) *Tumor Imaging With Monoclonal Antibodies.* Seminars in Nuclear Medicine. 25(2), 144-164.
- Blake, A.O. and Smith, R.G. (1991) *Desensitization studies using perfused rat pituitary cells show growth hormone-releasing hormone and His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ stimulate growth hormone release through distinct receptor sites.* Journal of Endocrinology. 129, 11-19.
- Bolton, A.E., Hunter, W.E. (1973) *The labeling of proteins to high specific activities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent.* Biochem. J. 133, 529-539.
- Borer, J.S., Bacharach, S.L., Green, M.V. et al. (1977) *Real-time radionuclide cineangiography in the noninvasive evaluation of global and regional left ventricular function at rest and during exercise in patients with coronary-artery disease.* N. Eng. J. Med. 296, 839-844.
- Bowers, C.Y., Momany, F., Reynolds, G.A., Chang, D., Hong, A., Chang, K. (1980) *Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro.* Endocrinology. 106, 663-667.
- Bowers, C.Y., Sartor, A.O., Reynolds, G.A., Badger, T.M. (1991) *On the Action of the Growth Hormone-Releasing Hexapeptide, GHRP.* Endocrinology. 128(4), 2027-2035.
- Bowers, C.Y. (1993) *Growth Hormone-Releasing Peptide - Structure and Kinetics.* J. of Pediatric Endocrinology. 6(1), 21-31.
- Brunings, K.J. (1947) *Preparation and Properties of the Iodohistides.* J. Amer. Chem. Soc. 69, 205-208.
- Burgus, R., Butcher, M., Amoss, M., Ling, N., Monahan, M.W., Rivier, J., Fellows, T., Blackwell, R., Vale, W., Guillemin, R. (1972) *Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone factor (LRF).* Proc Natl. Acad. Sci. USA. 69, 278-285.
- Carone, F.A., Stettler-Stevenson, M.A., May, V., LaBarbera, A., Flouret, G. (1987) *Differences between in vitro and in vivo degradation of LH-RH by rat brain and other organs.* Am. J. Physiol. 253, E317-E321.
- Cella, S. G., Locatelli, V., Poratelli, M., De Gennaro Colonna, V., Imbimbo, B.P., Deghenghi, R., Müller, E.E. (1995) *Hexarelin a Potent GHRP Analogue: Interactions With GHRH and Clonidine in Young and Aged Dogs.* Peptides. 16(1), 81-86.
- Cheng, K., Chan, W.W.S., Barreto, A., Convey, E.M., Smith, R.G. (1989) *The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ on growth hormone (GH)-releasing factor-stimulated GH release and intracellular adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in the rat primary cell culture.* Endocrinology. 124, 2791-2798.

- Clayton, R.N., Catt, K.J. (1980) *Receptor-binding affinity of gonadotropin-releasing hormone analogs: analysis by radioligand-receptor assay*. *Endocrinology*. 106, 1154-1159.
- Codd, E.E., Shu, A.Y.L., Walker, R.F. (1989) *Binding of a growth hormone releasing hexapeptide to specific hypothalamic and pituitary binding sites*. *Neuropharmacology*. 28, 1139-1144.
- Conley, L. K., Teik, J.A., Deghenghi, R., Imbimbo, B.P., Giustina, A., Locatelli, V., Wehrenberg, W.B. (1995) *Mechanism of Action of Hexarelin and GHRP-6: Analysis of the Involvement of GHRH and Somatostatin in the Rat*. *Neuroendocrinology*. 61, 44-50.
- Conn, P.M., Crowley, W.F. Jr. (1991) *Gonadotropin-releasing hormone and its analogues*. *N. Engl. J. Med.* 324, 93-103.
- Coy, D.H., Horvath, A., Nokola, M.V. Coy, E.J., Erchegyi, J., Schally, A.V. (1982) *Peptide antagonist of LHRH: large increases in antiovulatory activities produced by basic D-amino acids in the six position*. *Endocrinology*. 110, 1445-1449.
- Dahl, K.D., Bicsac, T.A., Hsueh, A.J.W. (1988) *Naturally occurring antihormones: secretion of FSH antagonists by women treated with a GnRH analog*. *Science*. 239, 72-74.
- Daneshdoost, L., Pavlou, S.N., Molitch, M.E., Gennarelli, T.A., Savino, P.J., Sergott, R.C., Bosley, T.M., Rivier, J.E., Vale, W.V., Snyder, P.J. (1990) *Inhibition of follicle-stimulating hormone secretion from gonadotroph adenomas by repetitive administration of a gonadotropin-releasing hormone antagonist*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71, 92-97.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1990) *Molecular Cell Biology*. (2e édition) Scientific American Books, New York.
- Davidson, J. S., Flanagan, C.A., Becker, I.I., Illing, N., Sealton, S.C., Millar, R.P. (1994) *Molecular function of the gonadotropin-releasing hormone receptor: insights from site-directed mutagenesis*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 100, 9-14.
- Deghenghi, R., Boutignon, F., Wüthrich, P., Lenaerts, V. (1993) *Antarelix (EP 24332) a novel water soluble LHRH antagonist*. *Biomed and Pharmacother.* 47, 107-110.
- Deghenghi, R., Cananzi, M.M., Torsello, A., Battisti, C., Müller, E.E., Locatelli, V. (1994) *GH-releasing activity of Hexarelin, a new Growth Hormone-Releasing Peptide (GHRP), in infant and adult rats*. *Life Sciences*. 54(18), 1321-1328.
- Dickson, S. L., Leng, G., Robinson, I.C.A.F. (1993) *Systemic Administration of Growth Hormone-Releasing Peptide Activates Hypothalamic Arcuate Neurons*. *Neurosciences*. 53(2), 303-306.

Dondi, D., Limonta, P., Moretti, R.M., Marelli, M.M., Garattini, E., Motta, M. (1994) *Antiproliferative Effects of Luteinizing Hormone-releasing Hormone (LHRH) Agonists on Human Androgen-independent Prostate Cancer Cell Line DU 145: Evidence for an Autocrine-inhibitory LHRH Loop*. *Cancer Research*. 54, 4091-4095.

Eidne, K.A., Flanagan, C.A., Millar, R.P. (1985) *Gonadotropin-releasing hormone binding sites in human breast carcinoma*. *Science*. 229, 989.

Eidne, K.A., Flanagan, C.A., Harris, N.S., Millar, R.P. (1987) *Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-binding sites in human breast cancer cell lines and inhibitory effects of GnRH antagonists*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 425.

Emons, G., Schröder, B., Ortmann, O., Westphalen, S., Schulz, K.-D., Schally, A.V. (1993) *High Affinity Binding and Direct Antiproliferative Effects of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogs in Human Endometrial Cancer Cell Lines*. *J. Clin. Endocrinol. Met.* 77 (6), 1458-1464.

Flouret, G., Stettler-Stevenson, M.A., Carone, F.A., Peterson, D.R. (1984) *Enzymatic degradation of LH-RH and analogs*. In: Vickery, B.H., Nestor, J.J. Jr., Hafez, E.S.E. (eds) *LHRH and its analogs*. MTP. Press, Lancaster, 397-410.

Foekens, J.A., Klijn, J.G.M. (1992) *Direct Antitumor Effects of LH-RH Analogs*. *Recent Results in Cancer Research*. 124, 7-17.

Forssell-Aronsson, E., Fjälling, M., Nilsson, o., Tisell, L.-E., Wängberg, B., Ahlman, H. (1995) *Indium-111 Activity Concentration in Tissue Samples After Intravenous Injection of Indium-111-DTPA-D-Phe-1-Octreotide*. *J. Nucl. Med.* 36, 7-12.

Frohman, L.A., Downs, T.R., Kelijman, M., Clarke, L.J., Thomas, G. (1990) *Somatostatin Secretion and Action in the Regulation of Growth Hormone Secretion*. *Metabolism*. 39(9), suppl.2, 43-45.

Gaudriault, G., Vincent, J.-P. (1992) *Selective Labeling of α - or ϵ -Amino Groups in Peptides by the Bolton-Hunter Reagent*. *Peptides*, 13, 1187-1192.

Guillaume, V., Magnan, E., Cataldi, M., Dutour, A., Sauze, N., Renard, M., Razafindraibe, H., Conte-Devolx, B., Deghenghi, R., Lenaerts, V., Olivier, C. (1994) *Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone Secretion Is Stimulated by a New GH-Releasing Hexapeptide in Sheep*. *Endocrinology*. 135 (3), 1073-1076.

Guillemin, R. (1978) *Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron*. *Science*. 202, 390-402.

Guyton, A.C. (1987) *Human Physiology and Mechanisms of Diseases*. Fourth edition. W.B. Saunders Company. 631-632.

Habenicht, U.F., Schneider, M.R., El Etreby, M.F. (1990) *Effect of the new potent LH-RH antagonist antide*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37, 937-942.

- Hadley, M.E. (1992) *Endocrinology*. (3e édition). Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Henze, E., Robinson, G.D., Khul, D.E., Schelbert, H.R. (1982) *Tc-99m Dextran: A New Blood-Pool-Labeling Agent for Radionuclide Angiocardiology*. J. Nucl. Med. 23, 348-353.
- Holmberg, A., Marquez, M., Westlin, J.-E., Nilsson, S. (1994) *Preparation, In Vitro Binding, And Technetium-99m Labelling of Somatostatin-Dextran Conjugates*. Antibody, immunoconjugates, and radiopharmaceuticals. 7(4), 253-259.
- Hsueh, A.J.W., Schaeffer, J.M. (1985) *Gonadotropin-releasing hormone as a paracrine hormone and neurotransmitter in extra-pituitary sites*. J. Steroid Biochem. 23(5B), 757-764.
- Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fotherhill, L.A., Morgan, B.A., Morris, H.R. (1975) *Identification of two related peptides from the brain with potent opiate agonist activity*. Nature. 258, 577-579.
- Hughes, W.L. (1957) *The Chemistry of Iodination*. Annals New York Academy of Sciences. 70, 3-18.
- Huhtaniemi, I.T., Dahl, K.D., Rannikko, S., Hsueh, A.J. (1988) *Serum bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone in prostatic cancer patients during gonadotropin-releasing hormone agonist treatment and after orchidectomy*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 66, 308-313.
- Hunter, W.M. and Greenwood, F.C. (1962) *Preparation of Iodine-131 Labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity*. Nature. 495-496.
- Hussain, A.A., Awad, R., Crooks, P.A., Dittert, L.W. (1993) *Chloramine-T in Radiolabeling Techniques: Kinetics and Mechanism of the Reaction between Chloramine-T and Amino Acids*. Analytical Biochemistry. 214, 495-499.
- Jorgensen, E.C., Slade, P. (1971) *Thyroxine Analogs. 20. Substituted 1- and 2- Naphthyl Ethers of 3,5-Diiodotyrosine*. J. Med. Chem. 14(11), 1023-1026.
- Karonen, S.-L. (1990) *Developments in techniques for radioiodination of peptide hormones and other proteins*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 50 (Suppl. 201), 135-138
- Katzung, B.G. (1995) *Basic and clinical pharmacology*. 6th edition, Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut, 460-477.
- Klibanski, A., Jameson, J.L., Killer, B.M.K., Crowley, W.F. Jr., Zervas, N.T., Rivier, J., Vale, W.V., Bikkal, H. (1989) *Gonadotropin and alpha-subunit responses to chronic gonadotropin-releasing hormone analog administration in patients with glycoprotein hormone-secreting tumors*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 68, 81-86.
- Korbonits, M., Trainer, P.J., Besser, G.M. (1995) *The effect of an opiate antagonist on the hormonal changes induced by hexarelin*. Clinical Endocrinology. 43, 365-371.

- Krenning, E.P., Kooij, P.P., Bakker, W.H., Breeman, W.A.P., Postema, P.T.E., Kwekkeboom, D.J., Oei, H.Y., De Jong, M., Visser, T.J., Reijs, A.E.M., Lamberts, S.W. (1994a) *Radiotherapy with a Radiolabeled Somatostatin Analogue, [¹¹¹In-DTPA-D-Phe]-Octreotide: A Case History*. Ann. New York Acad. Sci. 496-506.
- Krenning, E.P., Kwekkeboom, D.J., De Jong, M., Visser, T.J., Reubi, J.-C., Bakker, W.H., Kooij, P.P., Lamberts, S.W. (1994b) *Essentials of Peptide Receptor Scintigraphy With Emphasis on the Somatostatin Analog Octreotide*. Seminars in Oncology. 21(5), suppl.13, 6-14.
- Krohn, A.K., Knight, L.C., Harwig, J.F., Welch, M.J. (1977) *Difference in the sites of iodination of proteins following four methods of radioiodination*. Biochemica et Biophysica Acta, 490, 497-505.
- Lamberts, S.W.J., Bakker, W.H., Reubi, J.-C., Krenning, E.P. (1990) *Clinical Application of Somatostatin Analogs; Part I. Treatment with Sandostatin and In Vivo Localization of Tumors With Radiolabeled Somatostatin Analogs*. Metabolism, 39(9), suppl.2, 152-155.
- Langone, J.J. (1989) *Radioiodination by Use of the Bolton-Hunter and Related Reagents*. Methods in Enzymology. 70, 221-243.
- Laron, Z., Frenkel, J., Gil-Ad, I., Klinger, B., Lubin, E., Wuthrich, P., Boutignon, F., Lenaerts, V., Deghenghi, R. (1994) *Growth hormone releasing activity by intranasal administration of synthetic hexapeptide (hexarelin)*. Clinical Endocrinology 41, 539-541.
- Lei, T., Bucherfelder, M., Fahlbusch, R., Adams, E.F. (1994) *Growth hormone (GH) releasing peptide (GHRP) stimulated formation of inositol phosphates in human pituitary somatotrophinomas*. Journal of Endocrinology. Abstract. 143, suppl. 52.
- Lewin, M.J., Reyl-Desmars, F., Ling, N. (1983.) *Somatocrinin receptor coupled with cAMP-dependent protein kinase on the anterior pituitary granules*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 6538-6542.
- Limonta, P., Dondi, D., Moretti, R.M., Maggi, R., Motta, M. (1992) *Antiproliferative Effects of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonists on the Human Prostatic Cancer Cell Line LNCaP*. J. Clin. Endocrinol. Met. 75(1), 207-212.
- Loumaye, E. D. and Catt, K. J. (1983) *Agonist-Induced Regulation of Pituitary Receptors for Gonadotropin Releasing Hormone*. The Journal of Biological Chemistry. 258(19), 12002-12009.
- Macaulay, V.M. (1992) *Insulin-like growth factors and cancer*. Br. J. Cancer. 65, 311-320.
- Maccario, M., Arvat, E., Procopio, M., Gianotti, L., Grottoli, S., Imbimbo, B.P., Lenaerts, V., Deghenghi, R., Camanni, F., Ghigo, E. (1995) *Metabolic Modulation of the Growth Hormone-Releasing Activity of Hexarelin in Man*. Metabolism, 44(1), 134-138.
- Marshall, J. C. and Odell, W. B. (1975) *Preparation of Biologically Active ¹²⁵I-LH-RH Suitable for Membrane-Binding Studies (38806)*. Proc. Soc. Exper. Bio. Med. 149, 351-355.

- Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.M., Arimura, A., Schally, A.V. (1971) *Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone: I. The proposed amino acid sequence*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 1334-1339.
- Miller, W.R., Scott, W.N., Morris, R., Fraser, H.M., Sharpe, R.M. (1985) *Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist*. Nature. 313, 231.
- Moretti, J.-L., Rigo, P., Bischof-Delaloye, A., Taillefer, R., Caillat-Vigneron, N., Karcher, G. (1991) *Imagerie nucléaire fonctionnelle*. (eds) Masson, Paris.
- Mullen, P., Bramley, T., Menzies, G., Miller, B. (1993) *Failure to Detect Gn-RH Receptors in Human Benign and Malignant Breast Tissue and in MCF-7 and MDA-MB-231 Cancer Cells*. Eur. J. Cancer. 29A(2), 248-252.
- Müller, E. E., Cella, S.G., Parenti, M., Deghenghi, R., Locatelli, V., De Grennaro Colonna, V., Torsello, A., Cocchi, D. (1995) *Somatotropic Dysregulation in Old Mammals*. Hormone Research. 43, 39-45.
- Olson, G.A. R.D. Olson and A.J. Kustin (1989). *Endogenous opiate*. Peptides 10, 205-36.
- Ott, R.J., Flower, M.A., Babich, J.W., Marsdon, P.K. (1988) *The physics of radioisotope imaging*. In: *The physics of Medical Imaging*. (eds) S. Webb, IOP Publishing.
- Preisler, H.D. (1994) *The Leukemias*. Disease-a-Month. 40(10), 525-580.
- Prévost, G., Lanson, M., Thomas, F., Veber, N., Gonzalez, W., Beaupain, R., Starzec, A. (1992) *Molecular heterogeneity of somatostatin analog BIM-23014C receptors in human breast carcinoma cells using the chemical cross-linking assay*. Cancer Research. 52, 843-850.
- Reisine, T., He, H.-T., Rens-Domiano, S., Martin, J.-M., Raynor, K., Borislow, S., Thermos, K. (1990) *Biochemical Properties of Somatostatin Receptors*. Metabolism. 39(9), suppl.2, 70-73.
- Reissmann, T., Hilgard, P., Harleman, J.H., Engel, J., Comaru-Schally, A.M., Schally, A.V. (1992) *Treatment of experimental DMBA induced mammary carcinoma with Cetrorelix (SB-75): a potent antagonist of luteinizing hormone-releasing hormone*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 118, 44-49.
- Reubi, J.-C., Kvoles, L. (1992) *Somatostatin Receptors in Human Cell Carcinomas*. Cancer Research. 52, 6074-6078.
- Reubi, J.-C. (1993) *The role of peptides and their receptors as tumor markers*. Endocrin. Met. Clin. North America. 22(4), 917-939.
- Reubi, J.-C., Krenning, E., Lamberts, S.W.J., Kvoles, L. (1993a) *In Vitro Detection of Somatostatin Receptors in Human Tumors*. Digestion. 54, suppl.1, 76-83.

Reubi, J.-C., Horisberger, U., Studer, U.E., Waser, B., Laissue, J.A. (1993b) *Human Kidney as Target for Somatostatin: High Affinity Receptors in Tubules and Vasa Recta*. J. Clin. Endocrin. Met. 77(6), 1323-1328.

Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielensky, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S., Tsui, L.-C. (1989) *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of the Complementary DNA*. Science. 245, 1066-1072.

Roemer, D., Buescher, H.H., Hill, R.C., Pless, J., Bauer, W., Cardinaux, F., Closse, A., Hauser, D., Huguenin, R. (1977) *A synthetic enkephalin analogue with prolonger parenteral and oral analgesic activity*. Nature. 268, 547-549.

Roumi, M., Lenaerts, V., Boutignon, F., Wuthrich, P., Deghenghi, R., Bellemare, M., Adam A., Ong H. (1995) *Radioimmunoassay for hexarelin, a peptidic growth hormone secretagogue, and its pharmacokinetic*. Peptides. 16(7), 1301-6.

Saha, G.B. (1992) *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. (3^e édition). Springer-Verlag. New York. 83.

Salacinski, P.R.P., McLean, C., Sykes, J.E.C., Clement-Jones, V.V., Lowry, P.J. (1981) *Iodination of Proteins, Glycoproteins, and Peptides Using a Solid-Phase Oxidizing Agent, 1,3,4,6-Tetrachloro-3 α ,6 α -diphenyl Glycoluril (Iodogen)*. Analytical Biochemistry. 117, 136-146.

Sandow, J., König, W. (1979) *Studies with fragments of highly active analogue of luteinizing hormone releasing hormone*. J. Endocrinol. 8, 175-182.

Sandow, J., Stöckemann, K., Kibet, P.G., Lill, N.M., Neubauer, H., Jerabek-Sandow, G., Hahn, M., Kille, S. (1990) *Effect of a new LH-RH antagonist on DMBA-induced mammary tumours*. 2nd international symposium on "Hormonal manipulation of cancer: peptides, growth factors and new (anti)steroidal agents", Rotterdam, 9-11 April (Abstract 116). Eur. J. Cancer. 26, 175.

Schally, A.V., Coy, D.H. (1983) *Stimulatory and inhibitory analogs of LH-releasing hormone*. In: McCann, S.M., Dhindsa, D.S. (eds) *Role of peptides and proteins in control of reproduction*. Elsevier, New York. 89-110.

Schally, A. V. and Redding, T. W. (1987) *Somatostatin analogs as adjuncts to agonists of luteinizing hormone-releasing hormone in the treatment of experimental prostate cancer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 7275-7279.

Schally, A.V. (1988) *Oncological Applications of Somatostatin Analogues*. Cancer Research. 48, 6977-6985.

Schally, A. V., Srkalovic, G., Szende, B., Redding, T.W., Janaky, T., Jushasz, A., Korkut, E., Cai, R.-Z., Szepeshazi, K., Radulovic, S., Bokser, L., Groot, K., Serfozo, P., Comaru-Schally, A.M. (1990) *Antitumor Effect of Analogs of LH-RH and Somatostatin: Experimental and Clinical Studies*. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 37(6), 1061-1067.

Seever, R.H., Counsell, R.E. (1982) *Radioiodination Techniques for Small Organic Molecules*. Chem. Rev. 82, 575-590.

Segal-Abramson, T., Kitroser, H., Levy, J., Schally, A.V., Sharoni, Y. (1992) *Direct effect of luteinizing hormone-releasing hormone agonists and antagonists on MCF-7 mammary cancer cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 2336-2339.

Sharoni, Y., Bosin, E., Miinster, A., Levy, J., Schally, A.V. (1989) *Inhibition of growth of human mammary tumor cells by potent antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 1648-1651.

Solomons, T.W.G., Fernandez, J.E. (1988) *Organic chemistry*. Fourth edition. Wiley (eds), USA.

Sonoda, S., Schlamowitz, M. (1970) *Studies of ¹²⁵I Trace Labeling of Immunoglobulin G by Chloramine-T*. Immunochemistry. 7, 885-898.

Stryer, L. (1988) *Biochemistry*. (eds) Freeman, New York.

Szende, B., Lapis, K., Redding, T.W., Srkalovic, G., Shally, A.V. (1989) *Growth Inhibition of MXT mammary carcinoma by enhancing programmed cell death (apoptosis) with analogs of LH-RH and somatostatin*. Breast Cancer Research and Treatment. 14, 307-314.

Szende, B., Srkalovic, G., Groot, K., Lapis, K., Schally, A.V. (1990a) *Growth Inhibition of Mouse MXT Mammary Tumor by the Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Antagonist SB-75*. J. Natl. Cancer Institute. 82(6), 513-517.

Szende, B., Srkalovic, G., Groot, K., Lapis, K., Schally, A.V. (1990b) *Regression of nitrosamide-induced pancreatic cancers in hamsters treated with luteinizing hormone-releasing hormone antagonists or agonists*. Cancer Res. 50, 3716-3721.

Szepeshazi, K., Korkut, E., Szende, B., Lapis, K., Schally, A.V. (1991) *Histological changes in dunning prostate tumors and testes of rats treated with LH-RH antagonist SB-75*. Prostate. 18, 255-270.

Szőke, B., Horváth, J., Halmos, G., Rékási, S., Groot, K., Nagy, A., Schally, A.V. (1994) *LH-RH Analogue Carrying a Cytotoxic Radical Is Internalized by Rat Pituitary Cells In Vivo*. Peptides. 15(2), 359-366.

Thorner, M.O., Vance, M.L., Hartman, R.W., Holl, W.S., Evans, J.D., Veldhuis, J.D., Van Cauter, E., Copinschi, G., Bowers, C.Y. (1990) *Physiological Role of Somatostatin on Growth Hormone Regulation in Humans*. Metabolism. 39(9), suppl.2, 40-42.

Tsomides, T.J., Eisen, H. (1993) *Stoichiometric Labeling of Peptides by Iodination on Tyrosyl or Histidyl Residues*. Analytical Biochemistry. 210, 129-135.

Vakkuri, O., Lämsä, E., Rahkamaa, E., Ruotsalainen, H., Leppäluoto, J. (1984) *Iodinated Melatonin: Preparation and Characterization of the Molecular Structure by Mass and ¹H NMR Spectroscopy*. Analytical Biochemistry. 142, 284-289.

Vance, M.L. (1990) *Growth-Hormone-Releasing Hormone*. Clin. Chem. 36(3), 415-420.

Varnum, J.M., Thakur, M.L., Schally, A.V., Mayo, K.H. (1994) *Rhenium-Labeled Somatostatin Analogue, RC-160: ¹H-NMR and Computer Modeling Conformational Analysis*. Journal of Biological Chemistry. 269(17), 12583-8.

Veliçelebi, G., Saraswathi, P., Kaiser, E.T. (1986) *Design and biological activity of analogs of growth hormone releasing factor with potential amphiphilic helical carboxyl termini*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 5397-5399.

Vincze, B., Palyi, I., Daubner, D., Kremmer, T., Számel, I., Bodrogi, I., Sugár, J., Seprödi, J., Mezö, I., Teplán, I., Eckhardt, S. (1991) *Influence of luteinizing hormone-releasing hormone agonist on human mammary carcinoma cell lines and their xenografts*. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 38(2), 119-126.

Walkley, J.W., Tillman, J., Bonnar, J. (1976.) *The persistence of destran 70 in blood plasma following its infusion during surgery for prophylaxis against thromboembolism*. J. Pharm. Pharmac. 28, 29-31.

Weckbecker, G., Raulf, F., Stolz, B., Bruns, C. (1993) *Somatostatin analogs for diagnosis and treatment of cancer*. Pharmac. Ther. 60, 245-264.

Weckbecker, G., Tolcavai, L., Liu, R., Bruns, C. (1992) *Preclinical Studies on the Anticancer Activity of the Somatostatin Analogue Octreotide (SMS 201-995)*. Metabolism. 41(9, suppl.2), 99-103.

Weinbauer, G.F., Nieschlag, E. (1992) *LH-RH Antagonists: State of the Art and Future Perspectives*. Recent Results in Cancer Research. 124, 113-136

Wieland, T., Bodanszky, M. (1991) *The World of Peptides: A Brief History of Peptides Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Wilbur, D.S. (1992) *Radiohalogenation of Proteins: An Overview of Radionuclides, Labeling Methods, and Reagents for Conjugate Labeling*. Bioconjugate Chemistry. 3(6), 433-470.

Wolf, J., Covelli, I. (1969) *Factors in the Iodination of Histidine in Proteins*. European J. Biochem. 9, 371-377.

Yano, T., Pinski, J., Szepeshazi, K., Halmos, G., Radulovic, S., Groot, K., Schally, A.V. (1994a) *Inhibitory Effect of Bombesin/Gastrin-Releasing Peptide Antagonist RC-3095 and Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Antagonist SB-75 on the Growth of MCF-7 MIII Human Breast Cancer Xenografts in Athymic Nude Mice*. Cancer. 73(4), 1229-1238.

Yano, T., Pinski, J., Radulovic, S., Schally, A.V. (1994b) *Inhibition of human epithelial ovarian cancer cell growth in vitro by agonistic and antagonistic analogues of luteinizing hormone-releasing hormone*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 1701-1705.

Annexe 1

Clairance sanguine

Modèles à 2 exponentiels

MK-678 (sur 24 heures)

Souris No.	Valeur A1	Valeur A2	Aire sous la courbe	1st moment Integral	Clairance (ml/hr)	Vol. Compart. Central (ml)	Vol. Steady State (ml)
1	9,06	48,12	5,77	1,72	17,33	1,75	5,16
2	3,92	34,10	6,25	4,09	16,01	2,63	10,49
3	8,00	42,49	5,12	1,77	19,52	1,98	6,74
5	3,89	33,16	6,75	5,16	14,82	2,70	11,34
MOYENNE \pm ESM		(1,2,3,5)	5,97	3,19	16.92 \pm 1.01	2.26 \pm 0.24	8.43 \pm 1.48

Hexarelin (sur 24 heures)

Souris No.	Valeur A1	Valeur A2	Aire sous la courbe	1st moment Integral	Clairance (ml/hr)	Vol. Compart. Central (ml)	Vol. Steady State (ml)
1	7,75	43,01	12,83	20,77	7,79	1,97	12,61
2	5,04	45,72	24,19	76,16	4,13	1,97	13,01
5	6,11	44,65	29,92	112,77	3,34	1,97	12,60
MOYENNE \pm ESM		(1,2,5)	22,32	69,90	5.09 \pm 1.37	1.97 \pm 0.00	12.74 \pm 0.14

Hexarelin-DTPA (sur 24 heures)

Souris No.	Valeur A1	Valeur A2	Aire sous la courbe	1st moment Integral	Clairance (ml/hr)	Vol. Compart. Central (ml)	Vol. Steady State (ml)
1	1035,00	-980,08	45,14	28,81	2,22	1,82	1,41
2	1787,10	-1749,40	33,26	15,13	3,01	2,65	1,37
3	21,72	59,82	43,86	62,26	2,28	1,23	3,24
4	13,86	61,76	39,60	64,32	2,53	1,32	4,10
MOYENNE \pm ESM		(3,4)	39,20	21,97	2.61 \pm 0.12	2.24 \pm 0.05	1.39 \pm 0.43

Antarelix (sur 24 heures)

Souris No.	Valeur A1	Valeur A2	Aire sous la courbe	1st moment Integral	Clairance (ml/hr)	Vol. Compart. Central (ml)	Vol. Steady State (ml)
1	4,21	25,04	41,71	176,76	2,40	3,42	10,16
2	15,48	12,67	26,66	41,68	3,75	3,55	5,86
3	4,79	23,25	38,57	150,43	2,59	3,57	10,11
4	7,98	11,73	22,46	48,30	4,45	5,07	9,58
MOYENNE \pm ESM		(1,2,3)	35,65	122,96	2.91 \pm 0.42	3.51 \pm 0.05	8.71 \pm 1.43

Assume 1gram. de plasma = 1ml

Annexe 1 (suite)

Élimination sanguine de l'iode

Souris (n)	Temps a.i.	Moyenne (%dose/g)	ESM (+/-)
3	0,01	10,63	1,02
3	0,5	5,88	0,83
3	1	2,69	0,42
3	2	3,25	0,95
3	3	2,13	0,38
3	5	0,54	0,17
4	12	0,05	0,02
3	24	0,06	0,02

Annexe 2

Calcul du nombre de mole d'iode dans 1 mCi.

1 mCi = 3.7×10^7 Bq (dés. x sec⁻¹), 1 mole = 6.02×10^{23} atomes (N. d'Avogadro)

Nd = nombre de désintégration, Na = nombre d'atôme, Activité = Nd x λ ,

T_{½p} = demi-vie physique du nucléide (60 jrs, ¹²⁵I; 8 jrs, ¹³¹I; 2.8 jrs, ¹¹¹In)

Exemple: pour l'iode-125:

$\lambda = \ln 2 / T_{½p}$, $\lambda = 1.34 \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$

Nd = Activité/ λ , Nd = 2.77×10^{14} désintégration

Si une désintégration = un atome d'iode-125

Na = Nd/N. d'Avogadro, 4.6×10^{-10} mole (1mCi)

2.3×10^{-10} mole (500µCi)

Ratio de mole:

Peptide (MK-678) = 0.03 µmole, Iode-125 = 0.23 nmole

Ratio = n. de mole du peptide/n. de mole d'iode

≈ 130:1

Annexe 3

Calcul de l'erreur

ESM

∴ Écart-type sur la moyenne

$$= \frac{\sqrt{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)}}{n(n-1)} \div \sqrt{n}$$

Où n est le nombre de l'échantillon, et x est chaque valeur de l'échantillon.